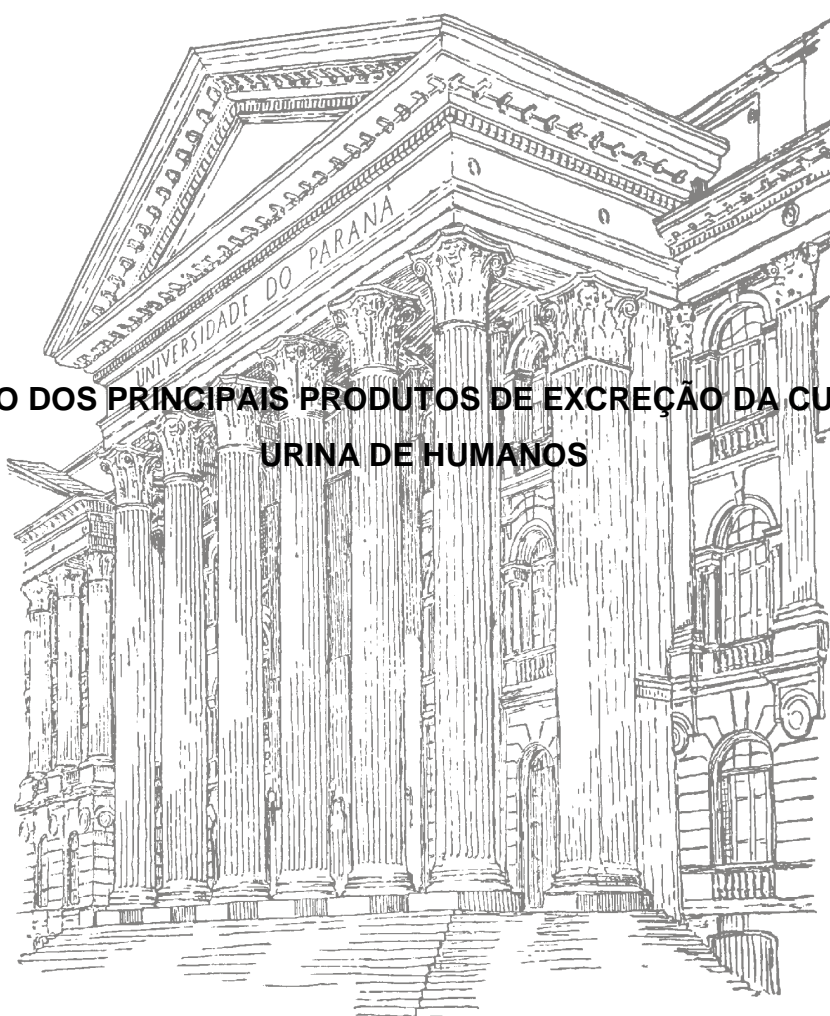


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LETÍCIA PAULA LEONART**

**AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS PRODUTOS DE EXCREÇÃO DA CUMARINA NA  
URINA DE HUMANOS**



**CURITIBA**

**LETÍCIA PAULA LEONART**

**AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS PRODUTOS DE EXCREÇÃO DA CUMARINA NA  
URINA DE HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo  
Co-orientador: Dr. João Cleverson Gasparetto

**CURITIBA**

**2015**

Leonart, Leticia Paula

Avaliação dos principais produtos de excreção da cumarina na urina de humanos /  
Leticia Paula Leonart - Curitiba, 2015.  
84 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientador: Dr. João Cleverson Gasparetto

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,  
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Cumarina. 2. 7-hidroxycumarina. 3. Metabólitos. 4. Urina. 5. Excreção. I. Pontarolo,  
Roberto. II. Gasparetto, João Cleverson. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.07566

# TERMO DE APROVAÇÃO

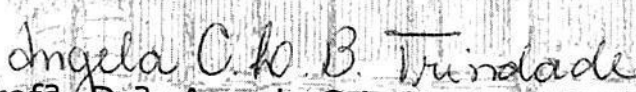
**LETICIA PAULA LEONART**


**Título: "AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS PRODUTOS DE EXCREÇÃO DA CUMARINA NA URINA DE HUMANOS"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

  
Prof. Dr. Roberto Pontarolo  
Orientador

  
Dr. João Cleverson Gasparetto  
Co-orientador

  
Profª. Dra. Angela Cristina Leal Badaró Trindade  
Universidade Federal do Paraná

  
Profª. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini  
Universidade Estadual Paulista

Curitiba, 03 de março de 2015.

*Enquanto você dedica o seu tempo à leitura dessa dissertação, eu a dedico a você.*

*Letras não lidas não formam palavras.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Pontarolo, por me conceder a oportunidade de integrar a sua equipe desde a época da graduação e acreditar no meu potencial para ingressar no mestrado. Também o agradeço por todos os ensinamentos ao longo desses anos.*

*Agradeço ao meu co-orientador Dr. João Gasparetto, por me incentivar a prosseguir na área acadêmica e por todos os conselhos e conhecimentos compartilhados.*

*À minha família, principalmente aos meus pais, Jussara Parra Leonart e Paulo José Leonart, por me darem apoio nos momentos difíceis, celebrarem comigo nos momentos de alegria e por me incentivarem a nunca parar de estudar.*

*Ao Pietro Lucas Agner Garmatter, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos e por ter paciência de ouvir durante horas sobre cromatografia e espectrometria de massas, tornando-se hoje um grande conhecedor do assunto.*

*Aos meus companheiros de laboratório Letícia Bonancio Cerqueira, Flavia Lada Degaut, Thais Martins Guimarães, Rômulo Pereira Ribeiro, Cleverson Ferreira Martins, Mariana Millan Fachi e Leandro Xavier Weiss por alegrarem a rotina do CEB.*

*A todos os colegas do laboratório de controle de qualidade, Helena Hiemisch Borba, Fernanda Stumpf Tonin, Suelem Tavares da Silva Penteado, Suzane Virtuoso, Thais Piazza de Melo, Camilla de Souza Madeira, Luna Assis Gonçalves, Ricardo Saad Henriques, Lorilei de Fátima Wzorek, Cassio Marques Perlin, Laiza Maria Steimbach, Larissa Mildemberger pelas conversas e bons momentos.*

*Aos estagiários que passaram pelo CEB, Wilton Hideki Kawaguchi, Reginaldo Thuler, Victor Concentino, Isabela Friebe, Alexandra David Piedade, Bruna Lui, Daniele Bueno de Paula por me ajudarem com as análises das SQR ou com o meu projeto.*

*Aos professores Alan Guilherme Gonçalves, Angela Cristina Leal Badaró Trindade, Francinete Ramos Campos, Obdulio Gomes Miguel, Vitor Kerber pelos ensinamentos e pelo interesse em meu projeto.*

*À Stephanie Melissa Siu Ló e Lais Danciguer Guanaes pela ajuda nas análises de RMN. Ao professor Dr. Guilherme Ianzi Sasaki por conceder seu laboratório para as análises de RMN.*

*A minha tia e professora Maria Suely Soares Leonart por despertar o interesse e paixão pela profissão de farmacêutica.*

*Às agências de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e Fundação Araucária.*

*Aos voluntários que se disponibilizaram a participar do estudo.*

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar qualitativamente os produtos de excreção da cumarina em urina humana. Participaram do presente estudo cinco voluntários adultos, que receberam via oral cápsulas contendo 500 mg de cumarina após jejum de oito horas. A urina dos voluntários foi coletada por um período de 24 horas. Para análise da amostra biológica, um método de *screening* de metabólitos rápido e facilmente executável por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução foi desenvolvido. O pré-tratamento da amostra consistiu na ultracentrifugação da urina por 15 minutos a 14000 rpm e a 4°C seguida de filtração em filtro de poliéster (0,2 µm) antes da injeção no cromatógrafo. Após aquisição dos dados, estes foram tratados com o auxílio do *software* MetaboLynx para a procura dos metabólitos oriundos da cumarina. Para que a confirmação estrutural pudesse ser realizada, os principais metabólitos encontrados passaram por um processo de isolamento e purificação através da coleta de picos cromatográficos, cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna. Foram encontrados 12 metabólitos, dos quais apenas quatro já haviam sido citados na literatura como parte do metabolismo humano da cumarina. Com o auxílio do *software* MetaboLynx, todas as biotransformações ocorridas na cumarina foram identificadas, porém, não foi possível confirmar por espectrometria de massas em quais locais da molécula as biotransformações ocorreram. Duas substâncias foram confirmadas pela comparação com padrão analítico (7-hidroxycumarina e ácido o-hidroxifenilacético) e, com o auxílio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear, as estruturas de dois metabólitos isômeros foram propostas: 7-hidroxycumarina glucoronida (sabidamente o principal metabólito da cumarina) e 5-hidroxycumarina glucoronida. Também foram encontrados dois isômeros hidroxilados e sulfatados da cumarina e dois isômeros di-hidroxilados e sulfatados. Outros metabólitos minoritários da cumarina também foram detectados. Não foi evidenciada a presença de cumarina livre ou do ácido o-cumárico na urina dos voluntários. O presente estudo mostrou que, apesar de a cumarina ser uma substância simples e já muito estudada, suas rotas de metabolização se encontravam incompletas. Isso nos levou à conclusão que o uso de ferramentas modernas é de extrema relevância para complementar o conhecimento do metabolismo de diversas drogas, especialmente porque os metabólitos ainda desconhecidos podem apresentar algum tipo de atividade biológica.

**Palavras-chave:** cumarina, 7-hidroxycumarina, metabólitos, urina, excreção.

## ABSTRACT

The purpose of this work was to qualitatively evaluate the excretory products of coumarin in the human urine. Five adult volunteers were enrolled in this study. Each one orally received a capsule containing 500 mg of coumarin after a fasting period of eight hours. The urine was collected for 24 hours. To analyze the biological sample and identify coumarin metabolites, a fast and easily executable screening method by ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry was developed. The sample pretreatment consisted in urine ultracentrifugation for 15 minutes (14000 rpm, 4°C), followed filtration in polyester filter (0.2 µm) before injection in the chromatograph. The acquired data were processed with MetaboLynx software to search for coumarin metabolites. To perform the structural confirmation, the major metabolites found have undergone an isolation and purification process through chromatographic peak collection, thin layer chromatography and column chromatography. Twelve metabolites were found, and only four had been previously described in the literature as part of the human metabolism of coumarin. With MetaboLynx software, all coumarin biotransformations were identified, however, it was not possible to confirm by mass spectrometry where in the molecule the biotransformation occurred. Two substances were confirmed by comparison to analytical standard (7-hydroxycoumarin and *o*-hydroxyphenylacetic acid) and, by nuclear magnetic resonance spectroscopy, the structures of two isomers metabolites were proposed: 7-hydroxycoumarin glucuronide (already know as the major metabolite of coumarin) and 5-hydroxycoumarin glucuronide. Two hydroxylated and sulfated coumarin isomers and two dihydroxylated and sulfated isomers were also found. Other minor coumarin metabolites were detected as well. Free coumarin or *o*-coumaric acid were not identified in volunteers' urine. This study showed that, although coumarin is a simple and well-studied substance, its metabolism routes were incomplete. This led us to the conclusion that the use of modern tools for drug metabolism identification is of extreme relevance, especially because the unknown metabolites can possess biological activity.

**Keywords:** coumarin, 7-hydroxycoumarin, metabolites, urine, excretion.



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

7-HC	–	7-hidroxycumarina
7-HCG	–	7-hidroxycumarina glucoronida
7-HCS	–	7-hidroxycumarina sulfatada
Å	–	Angstrom
<i>bd</i>	–	<i>Broad doublet</i> (duplete largo)
CCD	–	Cromatografia em camada delgada
CCDAE	–	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
CEB-UFPR	–	Centro de Estudos em Biofarmácia da Universidade Federal do Paraná
CLAE	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	–	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CLUE	–	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CLUE-EM	–	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas
COSY	–	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	–	Duplete
D <sub>2</sub> O	–	Água deuterada
Da	–	Dalton
ESI	–	Ionização por <i>electrospray</i>
FDM	–	Filtro por defeito de massa
HSQC	–	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>J</i>	–	Constante de acoplamento
KOH	–	Hidróxido de potássio
<i>m</i>	–	Multiplete
<i>m/z</i>	–	Relação massa carga
MHz	–	Megahertz
MS/MS	–	Espectrometria de massas sequencial
MS <sup>E</sup>	–	Espectrometria de massas com aquisição de dados utilizando baixa e alta energia de colisão simultaneamente
<i>o</i> -AHFA	–	Ácido <i>o</i> -hidroxifenilacético
PET	–	Poliéster
ppm	–	Partes por milhão
psi	–	Libra força por polegada quadrada
<i>p/v</i>	–	Peso/volume

QToF	–	Espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo
RMN	–	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>1</sup> H	–	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	–	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
rpm	–	Rotações por minuto
<i>t</i>	–	Tripleto
ToF	–	Espectrômetro de massas do tipo tempo de voo
Tr	–	Tempo de retenção
UGT	–	Uridina 5'-difosfato glucuronosiltransferase
UV	–	Ultravioleta
V	–	Volts
v/v	–	Volume/volume
v/v/v	–	Volume/volume/volume
δ	–	Deslocamento químico em partes por milhão

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	ESTRUTURA QUÍMICA DA CUMARINA.....	17
FIGURA 2 –	ESTRUTURA QUÍMICA DA 7-HIDROXICUMARINA GLUCORONIDA.....	20
FIGURA 3 –	ESTRUTURA QUÍMICA DA 7-HIDROXICUMARINA.....	20
FIGURA 4 –	ESQUEMA PROPONDO A BIOTRANSFORMAÇÃO DA CUMARINA EM COBAIAS.....	23
FIGURA 5 –	INTERMEDIÁRIO 3,4-EPÓXIDO DA CUMARINA.....	24
FIGURA 6 –	ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS DERIVADOS DA CUMARINA 3,4-METILCUMARINA; 3-METILCUMARINA; 4-METILCUMARINA; 6-METILCUMARINA; 3-METILOCTA-HIDROCUMARINA; 4-METILOCTA-HIDROCUMARINA.....	25
FIGURA 7 –	ESTRUTURA QUÍMICA DO O-HIDROXIFENILACETALDEÍDO.....	26
FIGURA 8 –	ESTRUTURA QUÍMICA DA CUMARINA; 7-HIDROXICUMARINA; ÁCIDO O-CUMARICO; ÁCIDO O-HIDROXIFENILACÉTICO.....	35
FIGURA 9 –	CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM SOLUÇÃO (250 NG/ML) APÓS OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS E ESPECTROMÉTRICOS.....	48
FIGURA 10 –	CROMATOGRAMAS DAS URINAS DE UM DOS VOLUNTÁRIOS OBTIDAS NO TEMPO ZERO E UMA HORA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE 500 MG DE CUMARINA.....	50
FIGURA 11 –	CROMATOGRAMAS E ESPECTRO DE MASSAS DO SINAL M/Z 337,0638 DA (MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO) GERADOS PELO SOFTWARE METABOLYNX A PARTIR DE DADOS COLETADOS DE UMA AMOSTRA DE URINA APÓS INGESTÃO DE CUMARINA E DE UMA AMOSTRA DE URINA CONTROLE.....	54
FIGURA 12 –	ESPECTROS DE FRAGMENTAÇÃO DOS ISÔMEROS DE M/Z 337,06 CORRESPONDENTES À BIOTRANSFORMAÇÃO DA CUMARINA EM HIDROXICUMARINA GLUCORONIDA.....	56

FIGURA 13 –	AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE FRAGMENTAÇÃO DOS ISÔMEROS DE M/Z 337,06 CORRESPONDENTES À BIOTRANSFORMAÇÃO DA CUMARINA EM HIDROXICUMARINA GLUCORONIDA.....	56
FIGURA 14 –	CROMATOGRAMA TOTAL DA URINA DE UM DOS VOLUNTÁRIOS COLETADA NO TEMPO DE 1 HORA APÓS INGESTÃO DE 500 MG DE CUMARINA EVIDENCIANDO O M1 (7-HIDROXICUMARINA GLUCORONIDA).....	57
FIGURA 15 –	ESTRUTURA QUÍMICA DA CUMARINA EVIDENCIANDO OS POSSÍVEIS SÍTIOS DE SUBSTITUIÇÃO.....	57
FIGURA 16 –	ESTRUTURA QUÍMICA DA N-ACETILCISTEÍNA.....	58
FIGURA 17 –	CROMATOGRAMA TOTAL DA URINA DE UM DOS VOLUNTÁRIOS COLETADA NO TEMPO DE 1 HORA APÓS INGESTÃO DE 500 MG DE CUMARINA, DEMONSTRANDO QUAIS FORAM CONSIDERADOS OS PRINCIPAIS METABÓLITOS DA CUMARINA.....	59
FIGURA 18 –	CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM PARA A COLETA DOS PICOS DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS DA CUMARINA ENCONTRADOS NA URINA HUMANA (M1, M2, M3 E M4) A PARTIR DA URINA COLETADA ENTRE 1 E 2 HORAS.....	60
FIGURA 19 –	PLACAS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS METABÓLITOS GLUCORINADOS (M1 E M2) E SULFATADOS (M3 E M4) DA CUMARINA ENCONTRADOS EM URINA HUMANA.....	62
FIGURA 20 –	ESTRUTURA DA 7-HIDROXICUMARINA GLUCORONIDA ISOLADA DA URINA DE VOLUNTÁRIOS QUE RECEBERAM 500 MG DE CUMARINA.....	65
FIGURA 21 –	ESTRUTURA DA 5-HIDROXICUMARINA GLUCURONIDA ISOLADA DA URINA DE VOLUNTÁRIOS QUE RECEBERAM 500 MG DE CUMARINA.....	66
FIGURA 22 –	ESQUEMA PROPONDO SEQUÊNCIAS DE METABOLIZAÇÃO DA CUMARINA EM HUMANOS A PARTIR DAS HIDROXILAÇÕES NAS POSIÇÕES 5 E 7....	68

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	ÍONS MOLECULARES, PARÂMETROS INDIVIDUAIS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS E TRANSIÇÕES MONITORADAS DE METABÓLITOS DA CUMARINA ENCONTRADOS NA URINA DOS VOLUNTÁRIOS.....	43
TABELA 2 –	NÚMERO DE POSSÍVEIS METABÓLITOS ENCONTRADOS PELO <i>SOFTWARE</i> METABOLYNX EM FUNÇÃO DO TEMPO DE COLETA DE URINA APÓS A PRIMEIRA ETAPA DE TRIAGEM PARA ELIMINAÇÃO DE RESULTADOS FALSO-POSITIVOS (MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO).....	51
TABELA 3 –	NÚMERO DE POSSÍVEIS METABÓLITOS ENCONTRADOS PELO <i>SOFTWARE</i> METABOLYNX EM FUNÇÃO DO TEMPO DE COLETA DE URINA APÓS A PRIMEIRA ETAPA DE TRIAGEM PARA ELIMINAÇÃO DE RESULTADOS FALSO-POSITIVOS (MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO).....	52
TABELA 4 –	MASSA NEUTRA, MODO DE IONIZAÇÃO, TEMPO DE RETENÇÃO E METABOLIZAÇÃO OCORRIDA NA CUMARINA APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL EM HUMANOS.....	52
TABELA 5 –	DADOS DE RMN $^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) E $^{13}\text{C}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ , 150 MHz VIA HSQC) DO METABÓLITO M2.....	66

## **LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1 –	PRINCIPAIS BIOTRANSFORMAÇÕES DE FASE I E FASE II..	33
------------	--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
1.1 Objetivo geral	17
1.2 Objetivos específicos	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	18
2.1 CUMARINA	18
2.2 METABOLISMO DA CUMARINA	20
2.3 TOXICIDADE DA CUMARINA E DE SEUS METABÓLITOS	24
2.4 VARIAÇÕES ENZIMÁTICAS POPULACIONAIS	28
2.5 MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS DA CUMARINA NA URINA	28
2.6 TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOTRANSFORMAÇÕES E DE METABÓLITOS	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	36
3.1 OBTENÇÃO DOS REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS	36
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES	37
3.3 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO	37
3.4 TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE PREPARO DA AMOSTRA	39
3.5 COMPOSIÇÃO DA ESPECIALIDADE FARMACÊUTICA ADMINISTRADA AOS VOLUNTÁRIOS	40
3.6 SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS, DELINEAMENTO DO ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE URINA	40
3.7 PREPARO DA AMOSTRA	41
3.8 PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO DOS DADOS DO SOFTWARE METABOLYNX XS	42
3.9 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DA CUMARINA	43
3.9.1 Coleta dos picos cromatográficos através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução	43
3.9.2 Cromatografia em camada delgada	45
3.9.3 Cromatografia em coluna	45
3.9.4 Análises por Ressonância Magnética Nuclear	46
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	47
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLUE-EM	47
4.2 TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE PREPARO DA AMOSTRA	50

4.3 AQUISIÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE DOS METABÓLITOS DA CUMARINA UTILIZANDO O SOFTWARE METABOLYNX.....	50
4.4 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DA CUMARINA .....	60
4.4.1 Coleta dos picos cromatográficos através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução .....	60
4.4.2 Cromatografia em camada delgada .....	62
4.4.3 Cromatografia em coluna .....	63
4.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO METABÓLITO M1 .....	65
4.6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO METABÓLITO M2 .....	66
4.7 PRODUTOS DE EXCREÇÃO E SEQUÊNCIAS DE METABOLIZAÇÃO DA CUMARINA EM HUMANOS.....	68
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As cumarinas compreendem uma grande classe de compostos presente em todo o reino vegetal. Essas substâncias são encontradas nas frutas, chás, sementes, vinhos e outros alimentos, o que demonstra que os humanos estão expostos a dietas que as contenham (LACY; O'KENNEDY, 2004).

A 1,2-benzopirona, também conhecida como cumarina simples, é uma das cumarinas mais estudadas pela comunidade científica. Essa substância é muito utilizada como fragrância para perfumes e sabonetes, e também é comum o seu uso para melhorar as características organolépticas de algumas bebidas alcoólicas. Clinicamente, a cumarina é utilizada como adjuvante para o tratamento de alguns tipos de câncer (LACY; O'KENNEDY, 2004), assim como no tratamento de insuficiência venosa e de linfedemas (FELTER *et al.*, 2006). Além disso, a cumarina é considerada o componente ativo e majoritário das folhas de guaco, uma espécie medicinal muito utilizada pela população brasileira contra afecções do trato respiratório (GASPARETTO, 2013).

O uso da cumarina em humanos é relatado de longa data e, por esse motivo, diversos estudos foram conduzidos para estabelecer o seu metabolismo. Os estudos demonstraram que a principal rota de metabolização da cumarina consiste na biotransformação hepática à 7-hidroxycumarina (fase I), a qual em seguida sofre reação de conjugação com ácido glicurônico (fase II), sendo biotransformada em 7-hidroxycumarina glucoronida (LACY; O'KENNEDY, 2004).

Em relação à excreção, estudos farmacocinéticos em humanos demonstraram que a principal via de eliminação da cumarina (>80%) é renal, através do seu metabólito glucoronado, a 7-hidroxycumarina glucoronida (RITSCHER *et al.*, 1977) e, em menor proporção, dos seus metabólitos hidroxilado, 7-hidroxycumarina, e sulfatado, 7-hidroxycumarina sulfatada (FORD *et al.*, 2001). A presença de ácido o-hidroxifenilacético também foi demonstrada na urina de humanos, porém a taxa de excreção dessa substância foi menor do que 6% (SHILLING; CRAMPTON; LONGLAND, 1969; MEINEKE *et al.*, 1998). O ácido o-hidroxifenilacético é o principal metabólito da cumarina encontrado na urina de ratos, e sabe-se que para estes animais a cumarina é tóxica (LAKE *et al.*, 1989, 1994a,b; DEN BESTEN *et al.*, 1990;

FENTEM *et al.*, 1992; FENTEM; FRY, 1993; BORN *et al.*, 1997; LAKE, 1984; BORN; HU; LEHMAN-MCKEEMAN, 1999).

Sendo assim, até então se acreditava que o metabolismo da cumarina havia sido totalmente elucidado. Porém, um estudo *in vivo* recente realizado em plasma humano revelou que a abertura do anel lactona gerando ácido *o*-cumárico também é uma importante rota de metabolização da cumarina (GASPARETTO, 2013). Esta descoberta mostrou que, ao contrário do que se acreditava, o metabolismo da cumarina ainda não foi completamente desvendado.

A compreensão dos mecanismos de detoxificação da cumarina em humanos é de extrema relevância, pois a permanência de metabólitos desconhecidos no organismo pode gerar toxicidade, como acontece com a rota do ácido *o*-hidroxifenilacético, metabólito da cumarina muito parecido com o ácido *o*-cumárico (encontrado em plasma humano) (LAKE, 1984; LAKE *et al.*, 1989, 1994a,b; DEN BESTEN *et al.*, 1990; FENTEM *et al.*, 1992; FENTEM; FRY, 1993; BORN *et al.*, 1997; BORN; HU; LEHMAN-MCKEEMAN, 1999; GASPARETTO, 2013).

O objetivo deste trabalho foi identificar quais são os produtos de excreção da cumarina encontrados na urina de humanos após ingestão oral dessa substância, e, a partir dos resultados obtidos, complementar as informações relativas à metabolização da cumarina na espécie humana.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os produtos de excreção da cumarina na urina de humanos.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM) para detecção da cumarina, 7-hidroxicumarina, ácido o-cumárico e ácido o-hidroxifenilacético na matriz urina a ser utilizado como método de *screening* para a procura desses e de outros metabólitos da cumarina nessa mesma matriz;
- Avaliar qualitativamente a presença dos metabólitos conhecidos da cumarina (7-hidroxicumarina na forma livre, glucorinada e sulfatada e ácido o-hidroxifenilacético) bem como dos metabólitos desconhecidos na urina de voluntários que receberam 500 mg de cumarina em cápsulas via oral, a partir do tratamento dos dados obtidos por CLUE-EM (cromatogramas e espectros de massas) pelo *software* MetaboLynx;
- Propor produtos de excreção da cumarina para a espécie humana.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CUMARINA

A cumarina, também conhecida como 1,2-benzopirona, é um sólido cristalino branco com odor perfumado semelhante ao de baunilha. O sabor é amargo e aromático. Possui massa monoisotópica de 146,0368 Da, faixa de fusão de 68 a 70°C e faixa de ebulição de 297 a 299°C. Apresenta coeficiente de partição octanol:água 24,55 (LAKE; 1999; PUBCHEM COMPOUND, 2013). É solúvel em etanol, clorofórmio, dietiléter e óleos e levemente solúvel em água (COHEN, 1979). A sua estrutura química está representada na Figura 1.

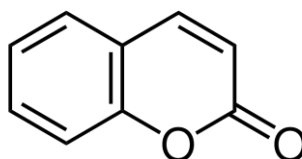


FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CUMARINA

A cumarina é um composto natural, estando presente em uma variedade de plantas e micro-organismos (SOINE, 1964; FEUER, 1974). É encontrada em grande quantidade em alguns óleos essenciais, principalmente no óleo de casca de canela, óleo de folha de cassia e óleo de lavanda. Também é encontrada em frutas, como o mirtilo e a amora silvestre, em chá verde e chicória (TNO, 1996). É também o principal componente ativo presente na planta medicinal guaco, muito utilizada pela população brasileira na forma de chás e xarope para o tratamento de afecções do trato respiratório (GASPARETTO *et al.*, 2012).

A cumarina é utilizada em perfumes como agente fixador e implementador. Além disso, é adicionada a sabonetes, detergentes, pastas de dente, produtos oriundos do tabaco, alimentos e bebidas alcoólicas como aromatizante. Desta forma, nós, humanos, estamos expostos a essa substância diariamente (OPDYKE, 1974; COHEN, 1979).

A cumarina também é utilizada em diferentes doses para fins medicinais. Seu uso é relatado em doses baixas (8,0 mg) para constrição venosa ou em doses altas (7,0 g) como terapia antineoplásica (LACY; O'KENNEDY, 2004). Em combinação com a troxerrutina, a cumarina é utilizada no tratamento de estase venosa, como, por exemplo, varizes, síndrome pós-trombótica, hemorroidas, edemas estáticos, dentre outros (GASPARETO *et al.*, 2012).

A cumarina (100 mg/dia) em combinação com a cimetidina (1200 mg/dia) reduziu a metástase de carcinoma renal humano (LACY; O'KENNEDY, 2004). Além disso, a cumarina preveniu a recorrência de melanoma em pacientes que receberam a dose de 50 mg/dia durante dois anos (THORNES *et al.*, 1994). Myers e colaboradores (1994) examinaram o efeito da cumarina na proliferação de duas linhagens de células de carcinoma renal (786-O e A-498) e de duas linhagens de carcinoma prostático maligno (DU145 e LNCaP). Depois de cinco dias de tratamento, a cumarina (250 e 500 µg/mL), inibiu o crescimento das quatro linhagens.

Quando administrada no duodeno de ratos (100 mg/kg), a cumarina inibiu a secreção ácida produzida por betanecol, sugerindo que essa substância pode influenciar o controle da secreção mediada pelo sistema nervoso parassimpático (BIGHETTI *et al.*, 2005).

Pelo efeito estimulatório em macrófagos e em outras células do sistema imune, a cumarina também foi empregada no tratamento de doenças crônicas como brucelose, mononucleose, micoplasmose, toxoplasmose e febre Q (LACY; O'KENNEDY, 2004).

A cumarina se apresentou efetiva no tratamento de edemas por elevação de proteínas, onde há acúmulo de proteínas no tecido após trauma ou inflamação, causando aumento da permeabilidade dos capilares, o que resulta em extravasamento de água para o tecido. Diversas doenças estão associadas com esse tipo de edema, incluindo condições crônicas (linfedema e elefantíase) e agudas (queimaduras e traumas) (LACY; O'KENNEDY, 2004).

O uso da cumarina foi proibido nos Estados Unidos em 1954 baseado em dados de hepatotoxicidade em ratos, antes da existência de qualquer relato sobre carcinogênese ou mutagênese (OPDYKE, 1974; COHEN, 1979). Após novos dados experimentais em 2004, a *European Food Safety Authority* concluiu que a cumarina

não se liga covalentemente ao DNA, sugerindo que seu mecanismo de ação não envolve genotoxicidade. Com isso, foi estabelecida uma dose diária máxima de cumarina de 0,1 mg/kg/dia, sendo que, se o uso da substância for por até três semanas, esse valor máximo pode ser triplicado (EFSA, 2008). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a dose diária de cumarina pode variar entre 0,5 a 5,0 mg (BRASIL, 2008). É importante mencionar que a cumarina em alimentos se encontra em uma matriz complexa, de modo que seu efeito pode ser influenciado por outros componentes presentes nessa matriz. Portanto, não se pode afirmar que os possíveis efeitos tóxicos ou benéficos da cumarina sejam os mesmos quando a substância é administrada isoladamente ou em meio a várias outras substâncias (ABRAHAM *et al.*, 2011).

## 2.2 METABOLISMO DA CUMARINA

Depois de ingerida, a cumarina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal. O alto coeficiente de partição, aliado à característica apolar dessa molécula, sugerem que a cumarina seja facilmente transportada pelas bicamadas lipídicas celulares por difusão passiva (LACY; O'KENNEDY, 2004).

Após a absorção, apenas 2 a 6% da cumarina atinge a circulação sistêmica na forma intacta (RITSCHER *et al.*, 1977; RITSCHER; BRADY; TAN, 1979; RITSCHER; HOFFMAN, 1981), o que evidencia uma disponibilidade muito baixa dessa substância. Estudos ainda demonstraram que, em humanos, a maior parte da cumarina disponível se encontra na forma de 7-hidroxicumarina glucoronida (Figura 2), o que pode indicar uma rápida conversão da cumarina antes mesmo de atingir a circulação sistêmica (RITSCHER *et al.*, 1977). O metabolismo da cumarina à 7-hidroxicumarina (7-HC) (Figura 3), de fase I, e à 7-hidroxicumarina glucoronida (7-HCG), de fase II, é extremamente rápido, com picos de concentração plasmática após administração oral entre 0,33 a 0,5 horas (RITSCHER *et al.*, 1977). A 7-hidroxilação da cumarina em humanos é catalisada através de um citocromo P450 específico denominado CYP2A6, o qual está presente no fígado (LAKE, 1999). O metabolismo de fase II (biotransformação à forma glucoronada) é mediado pela

ligação ao ácido glicurônico através de uma enzima transferase (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2012).

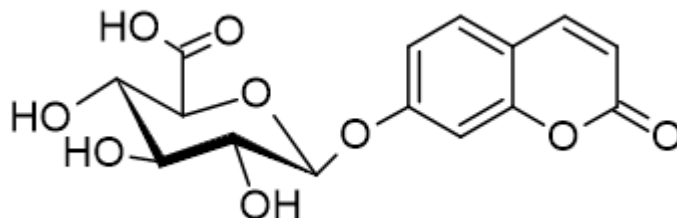


FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DA 7-HIDROXICUMARINA GLUCORONIDA

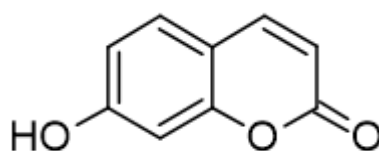


FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA 7-HIDROXICUMARINA

Estudos conduzidos em humanos demonstraram que a cumarina é amplamente distribuída no organismo, e que seu metabólito glucoronado (7-HCG) atinge todos os órgãos, exceto o cérebro (RITSCHER *et al.*, 1977; RITSCHER; HOFFMAN, 1981). Estudos também atestaram que, independente da espécie, a cumarina é extensivamente metabolizada e não há relatos de cumarina intacta ter sido encontrada na urina humana após a ingestão dessa substância (MORAN; O'KENNEDY; THORNES, 1987; EGAN; O'KENNEDY, 1992). Porém, a cumarina foi encontrada na urina de voluntários que receberam medicamentos chineses contendo plantas da ordem *Umbelliferae*, nas quais é comum a presença da cumarina propriamente dita (1,2-benzopirona) e de furocumarinas (psoralenos), em quantidades menores do que 4% (WANG; JIANG, 2006). Nenhuma evidência de acúmulo significativo de cumarina ou de seus metabólitos foi encontrada em tecidos de cobaias (KAIGHEN; WILLIAMS, 1961; VAN SUMERE; TEUCHY, 1971).

Existem notórias diferenças nas rotas de excreção da cumarina entre as espécies. Em ratos, grande parte dos metabólitos é eliminada via bile, com elevadas proporções da dose sendo excretadas pelas fezes (cerca de 50%) (WILLIAMS; MILLBURN; SMITH, 1965). Em outras espécies, como hamster siriano, coelhos e

babuínos, a excreção urinária é a principal rota de eliminação (LAKE, 1999). Da mesma forma, as altas quantidades de metabólitos da cumarina encontrados na urina de humanos sugerem que há pouca ou não há excreção biliar (SHILLING; CRAMPTON; LONGLAND, 1969; MORAN; O'KENNEDY; THORNES, 1987; RAUTIO *et al.*, 1992; EGAN; O'KENNEDY, 1992; 1993; ISCAN, 1994; BOGAN *et al.*, 1995; ABRAHAM *et al.*, 2011).

Nas diferentes espécies, as vias de metabolismo da cumarina podem seguir a hidroxilação nos carbonos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (resultando em 3-, 4-, 5-, 6-, 7- e 8-hidroxicumarina) e a abertura do anel lactona, resultando em vários metabólitos, como: *o*-hidroxifenilacetaldeído, *o*-hidroxifeniletanol, ácido *o*-hidroxifenilacético (*o*-AHFA), ácido *o*-hidroxifenilático, ácido *o*-cumárico e ácido *o*-hidroxifenilpropiónico (ácido melilótico). Outros metabólitos da cumarina incluem a 6,7-di-hidroxicumarina e a di-hidroxicumarina (LAKE, 1999).

O principal metabólito encontrado na urina de humanos é a 7-hidroxicumarina, especialmente na forma glucoronada (SHILLING; CRAMPTON; LONGLAND 1969; MORAN; O'KENNEDY; THORNES, 1987; EGAN *et al.*, 1990; EGAN; O'KENNEDY, 1992; CHOLERTON; IDLE; VAS, 1992; RAUTIO *et al.*, 1992; ISCAN *et al.*, 1994). Foram encontrados níveis elevados de 7-HC na urina de humanos independentemente de a dose administrada de cumarina ter sido baixa ou alta (LAKE, 1999). A presença de 7-hidroxicumarina sulfatada (7-HCS) na urina humana também foi relatada, após absorção dérmica de cumarina (FORD *et al.*, 2001).

Diversos estudos foram realizados para determinação de 7-HC ou 7-HCG na urina de humanos após ingestão de cumarina (SHILLING; CRAMPTON; LONGLAND, 1969; MORAN; O'KENNEDY; THORNES, 1987; CHOLERTON; IDLE; VAS, 1992; EGAN; O'KENNEDY, 1992; 1993; RAUTIO *et al.*, 1992; DEMPSEY *et al.*, 1993; ISCAN *et al.*, 1994; BOGAN *et al.*, 1995; 1996; RUNKEL; TEGTMEIER; LEGRUM, 1996; WANG; LIEN, 2004; WANG; JIANG, 2006; ABRAHAM *et al.*, 2011). A recuperação da cumarina na urina encontrada na forma de 7-HC total (forma livre mais a forma conjugada) foi de cerca de 60% na maioria dos casos (MORAN; O'KENNEDY; THORNES, 1987; RAUTIO *et al.*, 1992; ISCAN, 1994; ABRAHAM *et al.*, 2011). Outros estudos ainda apontam que mais de 90% da dose de cumarina é excretada na forma de 7-HC, porém a credibilidade dessa informação é duvidosa



devido ao baixo número de voluntários avaliados nesses estudos ( $n = 1, 2$  ou não revelado) (EGAN; O'KENNEDY, 1992; 1993; BOGAN *et al.*, 1995). Apesar de a maior parte dos estudos terem sido conduzidos com análise das urinas coletadas durante 24 horas, foi observado que praticamente toda a 7-HC é excretada em até cerca de 8 a 10 horas (MORAN; O'KENNEDY; THORNES, 1987; RAUTIO *et al.*, 1992; ISCAN *et al.*, 1994).

Embora estudos indiquem que em humanos a 7-hidroxilação é a principal rota de metabolismo da cumarina, outras vias minoritárias, como, por exemplo, a 3,4-epoxidação e outros caminhos ao *o*-AHFA são passíveis de ocorrência (LAKE, 1999). A via da 3,4-epoxidação é a rota preferencial de metabolismo da cumarina em ratos (KAIGHEN; WILLIAMS, 1961; LAKE, 1999; EFSA, 2008).

A presença de *o*-AHFA também foi relatada na urina de voluntários humanos ( $n=10$ ) que receberam 1 e 2 gramas de cumarina via oral e 250 mg via parenteral. Após 48 horas da administração da cumarina, a média de *o*-AHFA encontrada para as doses de 250 mg, 1 g, 2 g foi de, respectivamente, 1,52%, 3,52% e 5,13% em relação à dose administrada de cumarina (MEINEKE *et al.*, 1998). Outros estudos estimam a ausência ou a excreção do *o*-AHFA em pequenas quantidades (1 a 6%), demonstrando que em humanos o *o*-AHFA é um metabólito minoritário da cumarina independente da dose (SHILLING; CRAMPTON; LONGLAND, 1969; MORAN; O'KENNEDY; THORNES, 1987; WANG; LIEN, 2004).

Há poucas informações na literatura sobre o metabolismo da cumarina a ácido *o*-cumárico. Recentemente, um estudo farmacocinético revelou que em humanos o ácido *o*-cumárico é um importante metabólito biodisponível da cumarina (aproximadamente 30% dos níveis plasmáticos da cumarina) (GASPARETTO, 2013). Um estudo realizado em urina de ratos e coelhos demonstrou a presença de ácido *o*-cumárico, porém em quantidades inferiores aos níveis de *o*-AHFA (BOOTH *et al.*, 1959). Nesse mesmo estudo, sugeriu-se que tanto o ácido *o*-cumárico quanto o *o*-AHFA podem ser metabólitos diretos da cumarina. Além disso, também foi evidenciado que o *o*-AHFA pode ser originado a partir da metabolização do ácido *o*-cumárico. A presença de ácido *o*-cumárico na urina humana nunca foi relatada.

Na Figura 4, podemos observar um esquema propondo a biotransformação da cumarina em cobaias.

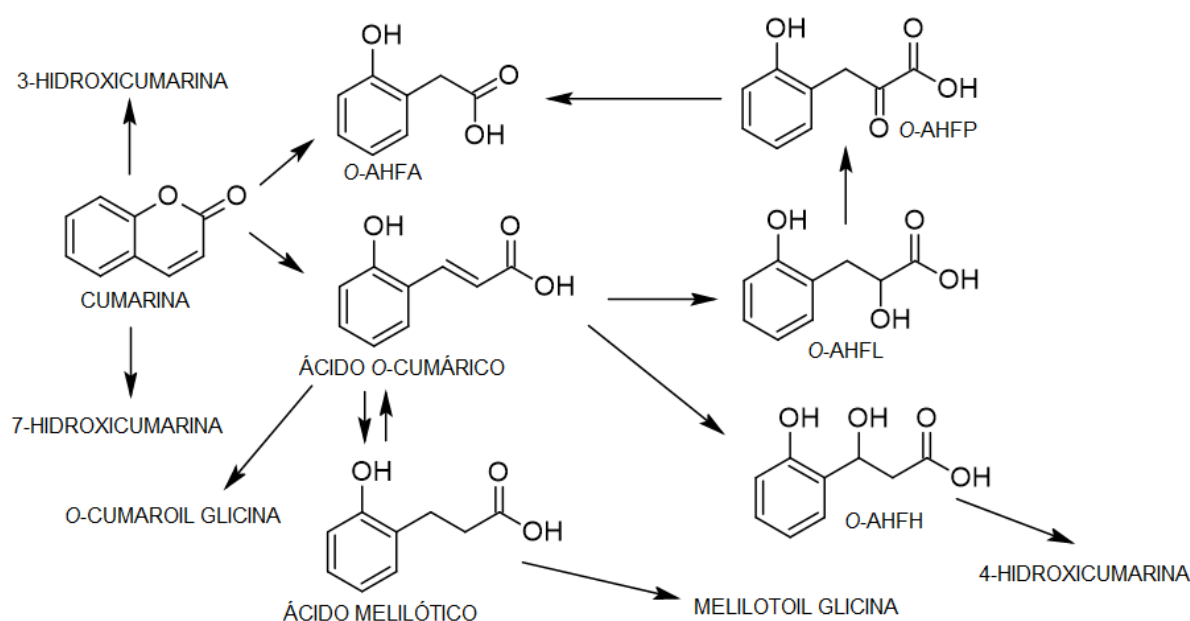


FIGURA 4 - ESQUEMA PROPONDO A BIOTRANSFORMAÇÃO DA CUMARINA EM COBAIAS. Dados: ácido o-hidroxifenilacético (O-AHFA); ácido o-hidroxifenilpirúvico (O-AHFP); ácido o-hidroxifenilático (O-AHFL) e ácido hidroxifenil-hidracrílico (O-AHFH). Fonte: adaptado de Booth *et al.* (1959)

### 2.3 TOXICIDADE DA CUMARINA E DE SEUS METABÓLITOS

Muitos estudos foram realizados para determinar se a cumarina possui algum potencial mutagênico ou genotóxico. Foi constatado que a cumarina não apresenta essas propriedades para a espécie humana (LAKE, 1999). Relatos de hepatotoxicidade são raros (COX; O'KENNEDY; THORNES, 1989; CASLEY-SMITH; CASLEY-SMITH, 1995).

Marshall e colaboradores (1994) realizaram um estudo para avaliar o potencial antineoplásico da cumarina em 54 pacientes que receberam doses de cumarina variando de 400 mg até 7000 mg, em combinação com cimetidina (300 mg) durante vários meses. Esse estudo também teve como objetivo verificar a dose máxima tolerada e o aparecimento de efeito tóxico. O sintoma mais comum foi identificado como náusea em pacientes que tomavam mais de 2,0 g por dia (20 pacientes). O autor sugeriu que a náusea provavelmente estava relacionada ao fato de a cumarina ser uma substância extremamente aromática e de que os pacientes deviam tomar muitas doses ao dia, pois o medicamento estava disponível

apenas na forma de comprimidos de 100 mg. Apenas um paciente, que tomava 5,0 g de cumarina diariamente, apresentou hepatotoxicidade reversível. Após diminuir a dose para 2,5 g, a hepatotoxicidade não voltou a aparecer. Portanto, esse estudo mostrou que a cumarina pode ser administrada em doses elevadas por períodos extensos sem causar danos à saúde. Nenhuma relação entre toxicidade e a formação de 7-HC foi evidenciada para humanos (LAKE, 1999).

Acredita-se que a toxicidade observada em algumas espécies não seja causada pela cumarina propriamente dita, mas sim por alguns dos seus metabólitos. Um número significativo de estudos demonstrou que tanto a toxicidade hepática aguda quanto crônica induzida pela cumarina em ratos está relacionada à presença da dupla ligação entre as posições 3 e 4 e à formação do intermediário 3,4-epóxido CYP dependente (Figura 5) (DEN BESTEN *et al.*, 1990, FENTEM *et al.*, 1992, FENTEM; FRY, 1993, BORN *et al.*, 1997; LAKE, 1984; LAKE *et al.*, 1989, 1994a,b).

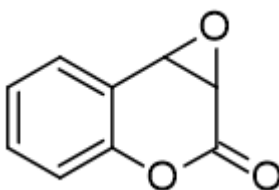


FIGURA 5 – INTERMEDIÁRIO 3,4-EPÓXIDO DA CUMARINA

Um estudo avaliou a toxicidade hepática em ratos causada pela cumarina e por alguns de seus derivados (3,4-dimetilcumarina, 3-, 4- e 6-metilcumarina e 3- e 4-metilocta-hidrocumarina) (Figura 6). Apenas a cumarina e a 3-metilcumarina, nas doses de 250 mg/kg e 274 mg/kg, respectivamente, causaram mortalidade de um rato entre cinco e de três ratos entre sete. O tratamento com cumarina nas doses de 125 e 250 mg/kg causou o aumento na concentração de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase plasmáticas, sendo que esta elevação não foi observada para nenhuma das outras substâncias estudadas. Apenas a cumarina causou alterações morfológicas hepáticas (necrose hepática dose-dependente). Desta forma, pôde-se concluir que somente a cumarina foi responsável por causar danos dentre as substâncias analisadas (LAKE *et al.*, 1994a). Devido à importância da dupla ligação 3,4 na hepatotoxicidade da cumarina, era de se esperar que a 3- ou a 4-metilocta-hidrocumarina não produzissem efeitos hepáticos, como foi realmente

observado. Contudo, as 3,4-dimetilcumarina, 3-, 4- e 6-metilcumarina, todas contendo a dupla ligação, também não apresentaram hepatotoxicidade no estudo realizado por Lake e colaboradores (1994a). A ausência da injúria nesse caso provavelmente não está relacionada com a falta de ligação ao citocromo P450, pois todas se ligam. Uma explicação para a não ocorrência de dano pelas 3,4-dimetilcumarina, 3-, 4-metilcumarina seria que a substituição nas posições 3 e 4 reduziria a formação do intermediário 3,4-epóxido devido ao impedimento estérico. No caso da 6-metilcumarina, o grupo metila no carbono 6 pode diminuir a carga eletrônica no hidrogênio da posição 7, favorecendo o metabolismo pela 7-hidroxilação (LAKE *et al.*, 1994a).

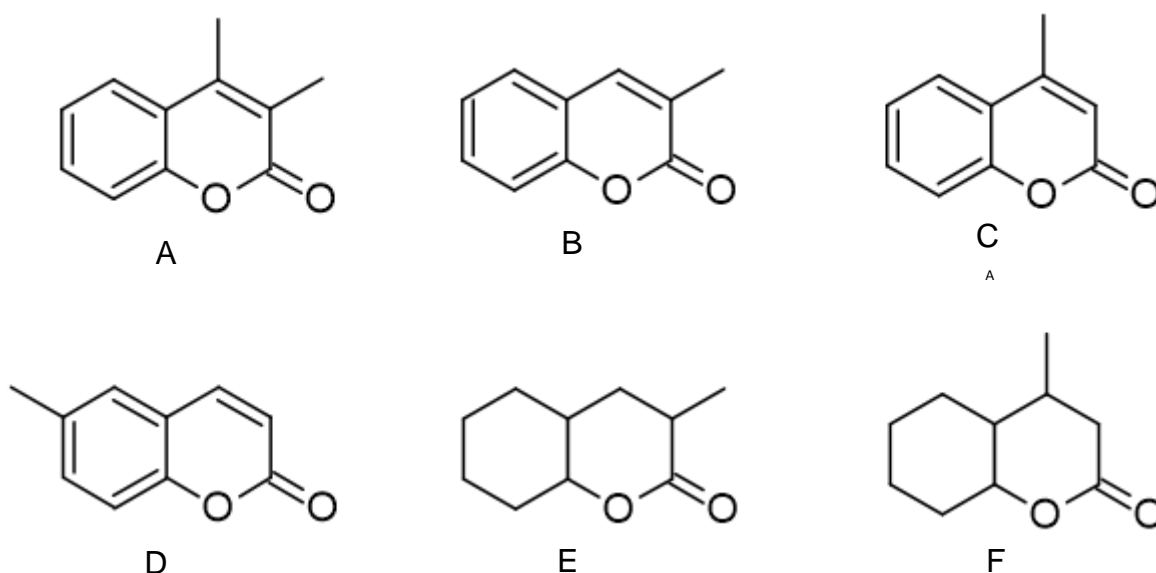


FIGURA 6 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS DERIVADOS DA CUMARINA (A) 3,4-METILCUMARINA; (B) 3-METILCUMARINA; (C) 4-METILCUMARINA; (D) 6-METILCUMARINA; (E) 3-METILOCTA-HIDROCUMARINA; (F) 4-METILOCTA-HIDROCUMARINA

Um outro estudo mostrou que, apesar de estável em solvente orgânico, o 3,4-epóxido é rapidamente e não-enzimaticamente rearranjado a o-hidroxifenilacetaldeído em meio aquoso (Figura 7). Este resultado indica que o o-hidroxifenilacetaldeído é formado diretamente da 3,4-epóxido-cumarina (BORN; HU; LEHMAN-MCKEEMAN, 1999).

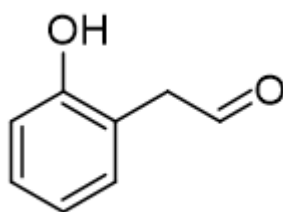


FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DO O-HIDROXIFENILACETALDEÍDO

A extensa formação de o-hidroxifenilacetaldeído em microssomas hepáticos de ratos e a relativa estabilidade desse aldeído em relação à 3,4-epóxido-cumarina, sugerem que tanto a 3,4-epóxido-cumarina como o o-hidroxifenilacetaldeído podem contribuir para a toxicidade mediada pela cumarina (BORN; HU; LEHMAN-MCKEEMAN, 1999). Aldeídos constituem um grupo de compostos relativamente reativos, e a toxicidade dessas moléculas já está bem estabelecida (FERON *et al.*, 1991).

Em um estudo realizado *in vitro*, em que foram avaliadas a toxicidade da cumarina e de alguns dos seus metabólitos em células CHO K1 e em hepatócitos de ratos, o o-hidroxifenilacetaldeído demonstrou ser altamente tóxico. As células CHO K1 não contêm enzimas do citocromo P450, portanto não ocorre biotransformação da cumarina e de seus metabólitos. Deste modo, este resultado indicou que o próprio o-hidroxifenilacetaldeído, e não um metabólito seu, é responsável pela toxicidade. Ademais, a cumarina causou toxicidade apenas aos hepatócitos, o que sugere que metabólitos seus (possivelmente o o-hidroxifenilacetaldeído) sejam responsáveis pela toxicidade (BORN; HU; LEHMAN-MCKEEMAN, 1999). Em contraste, o ácido o-hidroxifenilacético (produto da oxidação do o-hidroxifenilacetaldeído e o principal metabólito formado *in vivo* pelos ratos) não apresentou toxicidade a hepatócitos isolados de ratos (LAKE *et al.*, 1989). Dessa forma, a oxidação do o-hidroxifenilacetaldeído a ácido o-hidroxifenilacético por enzimas microssomais e citosólicas pode ser considerado um mecanismo de detoxificação presente nos ratos (FENTEM; FRY; WHITING, 1991).

Não há dados na literatura que contemplem a toxicidade do ácido o-cumárico.

## 2.4 VARIAÇÕES ENZIMÁTICAS POPULACIONAIS

A 7-hidroxilação da cumarina no fígado humano é realizada pela enzima do citocromo P450 CYP2A6, que está sujeita a variações interindividuais (CHOLERTON; IDLE; VAS, 1992, RAUTIO *et al.*, 1992). Cerca de 6% da população britânica possui mutação nessa enzima, tornando a metabolização à 7-hidroxicumarina comprometida (FERNANDEZ-SALGUERO *et al.*, 1995). A mutação deixa a proteína instável e cataliticamente inativa (YAMANO; TATSUNO; GONZALEZ, 1990). Em um estudo avaliando o metabolismo da cumarina (dose oral de 2,0 mg) em um paciente que sabidamente apresentava mutação na CYP2A6, juntamente com pacientes normais para essa enzima, observou-se, no mutante, quantidades muito maiores de ácido o-hidroxifenilacético na urina (em duas ocasiões diferentes, 54,6% e 45,9% da dose administrada de cumarina) em relação à 7-hidroxicumarina, diferentemente do que é observado para os indivíduos normais, em que a rota da 7-hidroxicumarina é a preferencial. Este fato demonstra uma alteração na rota de metabolismo para portadores de mutação nessa enzima (HADIDI *et al.*, 1997). Na população japonesa, a deficiência na enzima CYP2A6 pode chegar a atingir 1 em cada 4 pessoas (FERNANDEZ-SALGUERO *et al.*, 1995).

## 2.5 MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS DA CUMARINA NA URINA

Os métodos encontrados na literatura para determinação dos metabólitos da cumarina na urina compreendem: cromatografia em papel (SHILLING; CRAMPTON; LONGLAND, 1969), cromatografia em camada delgada (CCD) (BOOTH *et al.*, 1959, CHOLERTON; IDLE; VAS, 1992), cromatografia gasosa (SHILLING; CRAMPTON; LONGLAND, 1969), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (MEINEKE *et al.*, 1998), métodos espectrofluorimétricos (RAUTIO *et al.*, 1992; CHOLERTON; IDLE; VAS, 1992; EGAN; O'KENNEDY, 1993; ISCAN *et al.*, 1994; RUNKEL; TEGTMEIER; LEGRUM, 1996), voltametria de pulso diferencial

(DEMPSEY *et al.*, 1993), eletroforese capilar (BOGAN *et al.*, 1995, 1996), cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos ou detector de fluorescência (MORAN; O'KENNEDY; THORNES, 1987; EGAN; O'KENNEDY, 1992; WANG; LIEN, 2004; WANG; JIANG, 2006) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (ABRAHAM *et al.*, 2011).

Apesar de as cromatografias em papel e em camada delgada serem técnicas simples, as pesquisas realizadas através destas ferramentas foram de grande importância e essenciais para o estudo do metabolismo da cumarina. Mesmo Shilling e colaboradores tendo realizado seu estudo para determinação de o-AHFA por cromatografia em papel em 1969, os resultados obtidos (entre 1 a 6% de o-AHFA na urina de humanos) estão de acordo com os obtidos por Meineke e colaboradores em 1998, que utilizaram cromatografia gasosa. Booth e colaboradores realizaram suas análises em 1959 por cromatografia em camada delgada, procurando por metabólitos da cumarina na urina de ratos e coelhos. Apesar de esse estudo não trazer dados quantitativos, propôs rotas de metabolismo para a cumarina, ao identificar diversos metabólitos na urina desses animais.

Vários estudos utilizaram métodos espectrofluorimétricos pelo fato de a cumarina e a 7-HC serem substâncias fluorescentes. A maioria desses métodos foi baseada no método de Tan e colaboradores (1976), que procuraram pela cumarina e pela 7-HC em plasma humano. Em estudo comparando um método espectrofluorimétrico com um método de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), considerou-se que o segundo permite medições mais precisas. No método fluorimétrico, algumas amostras pareciam conter mais 7-HC do que quando analisadas por CCDAE e outras menos. Esse fato foi justificado pela interferência de outras substâncias fluorescentes nas amostras e pela diminuição da fluorescência da 7-HC por substâncias fortemente coloridas oriundas da dieta do indivíduo (CHOLERTON; IDLE; VAS, 1992).

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) é o avanço mais recente das técnicas de separação. Os princípios de separação são os mesmos da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), porém, a CLUE possibilita a aplicação de pressões mais elevadas ao sistema, o que permite o uso de colunas com partículas de menor diâmetro, aumentando a eficiência da separação

cromatográfica. Com partículas menores, o tamanho da coluna também pode ser reduzido, refletindo em análises mais rápidas sem perda de eficiência. Além disso, o fluxo da fase móvel pode ser diminuído, minimizando o gasto de solventes orgânicos (NOVÁKOVÁ; SOLICHOVÁ; SOLICH, 2006; MALDANER; JARDIM, 2009). Os métodos para determinação dos metabólitos de cumarina na urina realizados por CLAE (EGAN; O'KENNEDY, 1992; WANG; LIEN, 2004; WANG; JIANG, 2006) utilizaram colunas de 25 ou 30 cm com partículas de 5 ou 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e fluxo de 1 mL/min ou mais, acarretando análises longas e onerosas devido ao elevado consumo de fase móvel.

O acoplamento da cromatografia com a espectrometria de massas é crítico para a análise de matrizes complexas como a urina, pois, dessa forma, uma técnica de separação pode ser aliada a uma de identificação (DASS, 2007). Apenas dois estudos utilizaram a espectrometria de massas para determinação de metabólitos da cumarina em urina, sendo uma acoplada à cromatografia gasosa (MEINEKE *et al.*, 1998) e outra à CLAE (ABRAHAM *et al.*, 2011). Nos dois casos foi utilizado o analisador do tipo quadrupolo, que apresenta baixa resolução de massa, e, apesar da alta seletividade da técnica, apenas um analito foi quantificado em cada um dos métodos (*o*-AHFA e 7-HC, respectivamente). Além disso, nenhum desses métodos realizou um *screening*, ou seja, nenhum deles procurou por novos metabólitos.

## 2.6 TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOTRANSFORMAÇÕES E DE METABÓLITOS

A biotransformação de drogas e de outros xenobióticos em metabólitos hidrofílicos é essencial para a eliminação dessas substâncias do organismo, assim como para o término das atividades biológicas e farmacológicas. Em geral, as biotransformações resultam em metabólitos mais polares e inativos que são prontamente excretados do corpo humano. No entanto, em alguns casos, metabólitos com potente atividade biológica ou toxicológica podem ser gerados (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011).



As reações de biotransformação são catalisadas por enzimas e podem ser divididas em 2 grupos, chamados metabolismo de fase I e de fase II. As reações de fase I envolvem principalmente oxidação, redução, hidrólise e dealquilação (LIANG *et al.*, 2011). Essas reações normalmente resultam na perda da atividade farmacológica (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011). As reações de fase II são definidas como a conjugação de uma molécula xenobiótica (a droga ou seus metabólitos) com uma molécula ecobiótica (endógena). Dentre as reações do metabolismo de fase II, duas causam aumento da lipofilicidade (metilação e acilação), mas a maioria (glucoronidação, sulfatação, conjugação com glutathione etc) leva a um aumento da hidrofilia. Os compostos altamente polares formados são geralmente inativos e rapidamente excretados na urina ou fezes. As principais enzimas envolvidas nos processos de biotransformação são as do citocromo P450, a uridina 5'-difosfato glucuronosiltransferase (UGT) e a sulfotransferase (LIANG *et al.*, 2011; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011; XIE; CHEN; ZHONG, 2013).

O principal objetivo em um estudo de metabolismo é a identificação dos metabólitos e a determinação do tipo e da posição da molécula onde a biotransformação ocorreu. Essas tarefas podem ser árduas, pois matrizes biológicas são complexas, contém grandes quantidades de proteínas, lipídeos e outros compostos endógenos que podem interferir na detecção. Além disso, o metabolismo normalmente resulta em substâncias presentes em pequenas concentrações (ZHU; ZHANG; HUMPHREYS, 2011; XIE; CHEN; ZHONG, 2013).

Há algumas décadas, a cromatografia líquida com detecção por ultravioleta ou fluorescência era a principal técnica para a separação e quantificação de uma droga e de seus metabólitos. A identificação dos metabólitos era frequentemente difícil e laboriosa, sendo necessária a síntese de padrões e vários meses de trabalho (TOLONEN; TURPEINEN; PELKONEN, 2009). Atualmente, outras técnicas analíticas para a identificação de metabólitos de drogas são preferencialmente utilizadas. Dentre elas, a espectrometria de massas tem se mostrado essencial devido às características de alta sensibilidade, seletividade e rapidez das análises. A massa molecular pode ser medida através da relação massa carga ( $m/z$ ) do íon protonado ou desprotonado.

A cromatografia líquida oferece a capacidade de separar os metabólitos dos interferentes da matriz, facilitando a detecção. O acoplamento com a espectrometria

de massas com ionização à pressão atmosférica, como a ionização por *electrospray* (ESI), aumentou a capacidade dos laboratórios analíticos em identificar substâncias e realizar elucidação estrutural. Espectrômetros de massas de alta resolução apresentam exatidão de massa com erro menor do que 5 ppm, e, devido a essa característica, são utilizados para a identificação de metabólitos. A massa exata permite determinar a fórmula estrutural de uma molécula, ou, pelo menos, reduz a um número pequeno de candidatos (LIANG *et al.*, 2011; XIE; CHEN; ZHONG, 2013).

Os espectrômetros de massas mais apropriados para a identificação rápida e custo-efetiva de metabólitos e para a elucidação estrutural são os com analisador por tempo de voo (ToF), ou, especialmente, o quadrupolo-tempo de voo (QToF). Esses equipamentos apresentam como vantagem alta sensibilidade mesmo quando uma extensa faixa de massas é adquirida, possibilitando a identificação de todos os metabólitos esperados e não esperados em uma única corrida cromatográfica (TOLONEN; TURPEINEN; PELKONEN, 2009). Ainda, a utilização do híbrido (QToF) apresenta a vantagem de unir as características de alta exatidão de massa e alta resolução (~40.000) do ToF com a possibilidade de realizar experimentos de fragmentação de massas (MS/MS ou MS<sup>E</sup>), aumentando a capacidade de elucidação estrutural (LIANG *et al.*, 2011). Além disso, a rápida velocidade de aquisição de dados dos ToF permite que estes sejam acoplados à CLUE (TOLONEN; TURPEINEN; PELKONEN, 2009).

Na aquisição de dados do tipo MS<sup>E</sup>, é realizado um experimento de varredura total de massas (*full-scan*) alternando entre baixa e alta energia de colisão, o que resulta em dois grupos de dados. O *full-scan* de baixa energia apresenta basicamente os picos dos íons moleculares, enquanto que o de alta energia apresenta os fragmentos destes íons (pseudo espectro MS/MS) (ZHU; ZHANG; HUMPHREYS, 2011).

Aliadas à espectrometria de massas de alta resolução, ferramentas de mineração e processamento de dados vem sendo desenvolvidas, simplificando o processo de identificação de metabólitos. Dentre elas, as mais utilizadas incluem o filtro por defeito de massa (FDM), subtração de *background*, filtro de padrão isotópico, filtro de íon precursor e filtro de perda neutra, que podem ser aplicados de maneira combinatória. Essas ferramentas estão integradas em diversos *softwares* de processamento de dados, como o MetaboLynx (Waters Corporation), MetWorks

(Thermo Fisher Scientific) e Metabolite Pilot (AB Sciex). Estes *softwares* estão programados para detectar metabólitos conhecidos e desconhecidos a partir da comparação com uma amostra controle (XIE; CHEN; ZHONG, 2013).

O *software* utilizado em nosso estudo foi o MetaboLynx (Waters Corporation), que faz uso, essencialmente, das ferramentas de mineração de dados FDM, subtração de *background* (ruído de fundo) e filtro de padrão isotópico, além de permitir a criação de uma lista de metabólitos esperados e propor quais as biotransformações ocorreram.

Defeito de massa é a diferença entre a massa exata de uma molécula e sua massa nominal. Por exemplo, a cumarina possui a massa exata de 146,0368 Da e uma massa nominal de 146 Da, logo o seu defeito de massa é de +36,8 mDa. As biotransformações não resultam em uma grande modificação no defeito de massa das moléculas, pois os metabólitos normalmente possuem o mesmo cerne estrutural da molécula mãe. Portanto, a molécula original e seus metabólitos muito provavelmente terão defeitos de massas semelhantes. Desta forma, pode-se eliminar, através da aplicação de um filtro por defeito de massa, uma infinidade de substâncias encontradas na matriz biológica que não estejam relacionadas com a molécula mãe (ZHU; ZHANG; HUMPHREYS, 2011; LIANG *et al.*, 2011; XIE; CHEN; ZHONG, 2013).

*Backgrounds* intensos e interferentes de matriz são um desafio para a detecção de metabólitos *in vivo*, e normalmente os metabólitos das drogas não aparecem claramente visíveis em um cromatograma (LIANG *et al.*, 2011). A subtração do *background* é um algoritmo utilizado para subtrair os íons presentes no controle (ou seja, na matriz obtida antes da ingestão da substância em estudo) daqueles presentes na amostra, em uma mesma janela de tempo. Essa ferramenta tem seu uso limitado em espectrometria de massas de baixa resolução, pois, se um interferente isobárico nominal elui no mesmo tempo na amostra e no controle, o íon de interesse pode ser descartado. Porém, esse problema pode ser facilmente contornado com o uso da espectrometria de massas de alta resolução, pois nesse caso são considerados como interferentes da matriz apenas os íons com massa exatamente igual que aparecem no controle e na amostra em uma mesma janela de tempo (LIANG *et al.*, 2011; XIE; CHEN; ZHONG, 2013).

A abundância isotópica natural também pode ser utilizada como um filtro para ajudar a determinar a composição elementar de um metabólito. Compostos que possuem padrão isotópico distinto, pela presença de cloro e bromo, por exemplo, podem ser facilmente identificados por essa ferramenta (LIANG *et al.*, 2011). Além disso, é possível informar ao *software* quais átomos são esperados nos metabólitos de uma molécula, fato que facilita a identificação da fórmula molecular mais provável.

O *software* também compara a massa obtida do metabólito com a massa da substância mãe, sugerindo qual biotransformação possivelmente ocorreu, ao observar a diferença de massa entre as duas moléculas. Por exemplo, é sabido que uma oxidação resulta em uma diferença de massa entre a substância mãe e um metabólito oxidado de 15,9949 Da (ZHU; ZHANG; HUMPHREYS, 2011). Exemplos das principais biotransformações constam no Quadro 1.

BIOTRANSFORMAÇÃO	MUDANÇA NA FÓRMULA MOLECULAR	MUDANÇA NA MASSA (Da)
<i>Fase I</i>		
Perda de um grupo nitro	$-\text{NO}_2 + \text{H}$	-44,9851
Decarboxilação	$-\text{CO}_2$	-43,9898
Depropilação	$-\text{C}_3\text{H}_6$	-42,0468
Redução nitro	$+\text{H}_2 - \text{O}_2$	-29,9742
Desetilação	$-\text{C}_2\text{H}_4$	-28,0312
Desidratação	$-\text{H}_2\text{O}$	-18,0106
Demetilação	$-\text{CH}_2$	-14,0157
Desidrogenação (oxidação)	$-\text{H}_2$	-2,0157
Hidrogenação (redução)	$+\text{H}_2$	+2,0157
Metilação	$+\text{CH}_2$	+14,0157
Álcool em ácido carboxílico	$-2\text{H} + \text{O}$	+13,9792
Formação de cetona	$-2\text{H} + \text{O}$	+13,9792
Hidroxilação	$+\text{O}$	+15,9949
Epoxidação	$+\text{O}$	+15,9949
Hidratação	$+\text{H}_2\text{O}$	+18,0106
Metila para ácido carboxílico	$-2\text{H} + \text{O}_2$	+29,9741
Dihidroxilação	$+\text{O}_2$	+31,9898
<i>Fase II</i>		
Acetilação	$+\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$	+42,0106
Conjugação com glicina	$+\text{C}_2\text{H}_3\text{NO}$	+57,0215
Conjugação com sulfato	$+\text{SO}_3$	+79,9568
Conjugação com taurina	$+\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2\text{S}$	+107,0041
Conjugação com S-cisteína	$+\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}_2\text{S}$	+119,0041
Conjugação com N-acetilcisteína	$+\text{C}_6\text{H}_8\text{NO}_3\text{S}$	+161,0147
Conjugação com glucoronida	$+\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	+176,0321
Conjugação com S-glutationa	$+\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$	+305,0682

QUADRO 1 – PRINCIPAIS BIOTRANSFORMAÇÕES DE FASE I E FASE II. Fonte: adaptado de Tolonen, Turpeinen e Pelkonen (2009)

Em alguns casos, os dados de massa molecular e de perfil de fragmentação obtidos por espectrometria de massas podem não ser suficientes para afirmar com segurança de que metabólito se trata. Nestes casos, outras técnicas como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) devem ser utilizadas para complementar a identificação da substância (LIANG *et al.*, 2011). Porém, para ser analisado por RMN, o metabólito precisa apresentar certo grau de pureza, o que exige tarefas laboriosas de isolamento e purificação da substância de interesse (MA; CHOWDHURY, 2011). Além disso, a quantidade de amostra necessária é muito maior do que a utilizada em espectrometria de massas. Mesmo com os equipamentos mais avançados, no mínimo concentrações na escala de  $\mu\text{mol}$  são necessárias, o que é um grande desafio para a caracterização de metabólitos, uma vez que normalmente estes se encontram na matriz em quantidades diminutas. A maior parte (98,9%) do carbono presente na matéria orgânica não é capaz de ser detectada por RMN, pois o isótopo  $^{12}\text{C}$  apresenta números pares e idênticos de prótons e nêutrons, portanto seu *spin* nuclear resultante é zero. Desta forma, a baixa sensibilidade é a principal limitação do uso de RMN  $^{13}\text{C}$  para a elucidação de biomoléculas. Já o hidrogênio existente na natureza se encontra praticamente apenas na forma de  $^1\text{H}$ . Portanto, para a obtenção de espectros de RMN  $^1\text{H}$  uma quantidade relativamente menor de amostra é necessária (EISENREICH; BACHER, 2007).

A grande vantagem da ressonância magnética nuclear é a unicidade do espectro de cada substância, o que torna essa técnica altamente específica para confirmação e elucidação estrutural. Além disso, trata-se de uma técnica não-destrutiva (MAGGIO *et al.*, 2014).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Os reagentes utilizados foram: formiato de amônio (mínimo de 97%) da Spectrum Chemical (Gardena, EUA), acetonitrila (Panreac, Barcelona, Espanha), metanol (Panreac, Barcelona, Espanha), acetato de etila (Cromato Produtos Químicos Ltda, Diadema, Brasil), hidróxido de potássio (Merck, Rio de Janeiro, Brasil), metanol seco (Merck, Dasmstadt, Alemanha). A água ultrapura foi obtida através do Sistema de Purificação Milli-Q<sup>®</sup> da Millipore (Bedford, EUA).

Os padrões analíticos de cumarina (99,0%), 7-hidroxycumarina (99,8%), ácido o-cumárico (97,0%) e ácido o-hidroxifenilacético (99,0%) foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). As estruturas químicas dos padrões utilizados nesse estudo são apresentadas na Figura 8.

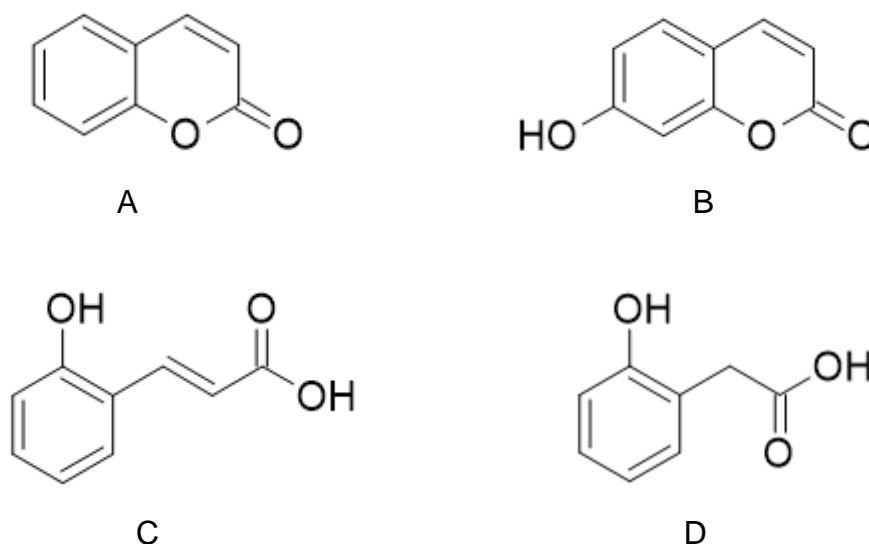


FIGURA 8 - ESTRUTURA QUÍMICA DA (A) CUMARINA; (B) 7-HIDROXICUMARINA; (C) ÁCIDO O-CUMARICO; (D) ÁCIDO O-HIDROXIFENILACÉTICO

### 3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções estoque de cumarina, 7-hidroxicumarina, ácido o-cumárico e ácido o-hidroxifenilacético foram preparadas, separadamente, em metanol, de modo a obter uma concentração final de 1 mg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoque através de diluição apropriada em acetonitrila/água (70:30 v/v), de acordo com a necessidade de cada experimento. As soluções estoque e de trabalho foram mantidas sob refrigeração a 4°C em frasco de vidro âmbar.

### 3.3 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

O método de *screening* foi desenvolvido em um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Acquity H-Class da Waters Corporation (Milford, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo tempo de voo (Xevo G2-S, Waters, Milford, EUA) com fonte de ionização por *electrospray*. Os padrões analíticos de cumarina, 7-hidroxicumarina, ácido o-cumárico e ácido o-hidroxifenilacético foram utilizados como substâncias de referência para desenvolvimento de um método adequado à procura dos metabólitos da cumarina na matriz urina. Os seguintes parâmetros cromatográficos e espectrométricos foram ajustados:

- Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila/água 95:5 v/v, ambos contendo 0,5 mmol/L de formiato de amônio, eluída em modo gradiente a 450 µL/min conforme segue: Tempo 0 a 5,00 min: A=85 a 50%; Tempo 5,01-6,50 min: A=5%; Tempo 6,51 a 8,7 min: A=85%.
- Coluna: Acquity UPLC BEH Shield RP18, 100 x 2,1 mm, partículas de 1,7 µm (Waters Corporation, Irlanda);
- Temperatura de forno da coluna: 50°C;
- Volume de injeção: 1 µL;

- Modo de aquisição dos dados: MS<sup>E</sup>;
- Energia de colisão: 4 V na aquisição em baixa energia e rampa de colisão de 20 a 40 V na aquisição em alta energia;
- Tempo de aquisição dos dados: 6,50 minutos;
- Parâmetros da fonte de ionização para o modo negativo: voltagem do capilar: -2200 V, voltagem do cone: 15 V, *source offset*: 10 V, temperatura da fonte: 150°C, temperatura de dessolvatação: 350°C, gás do cone: 50 L/h e gás de dessolvatação: 550 L/h;
- Parâmetros da fonte de ionização para o modo positivo: voltagem do capilar: +2800 V, voltagem do cone: 15 V, *source offset*: 10 V, temperatura da fonte: 150°C, temperatura de dessolvatação: 450°C, gás do cone: 50 L/h e gás de dessolvatação: 600 L/h;
- Faixa de leitura de massas: 50 a 750 *m/z*.

O nitrogênio de alta pureza utilizado como gás de dessolvatação e gás do cone foi produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA). O gás de colisão utilizado foi argônio com pureza >99,998% da White Martins Praxair Inc. (Curitiba, Brasil). Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram processados através dos *softwares* MassLynx V 4.1 e MetaboLynx XS da Waters Corporation (Milford, EUA).

Com o objetivo de garantir a precisão e a exatidão dos resultados, todas as massas adquiridas durante as análises foram corrigidas automaticamente por *lockspray*. Leucina encefalina da Waters Corporation (Milford, EUA) foi utilizada como *lockmass* na concentração de 1000 ng/mL. A infusão do *lockspray* foi realizada em fluxo de 20 µL/min. O calibrante utilizado foi formiato de sódio 0,5 mmol/L produzido a partir de hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemanha).



### 3.4 TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE PREPARO DA AMOSTRA

Para avaliar qual a melhor forma de preparo da amostra, foram testadas ultracentrifugação da urina com ou sem a adição de metanol, ambas seguidas de filtração.

Para condução do ensaio de ultracentrifugação da urina na presença de metanol, alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  do branco (urina livre dos analitos de interesse) foram transferidas para tubos *Eppendorf* e em seguida fortificadas com 25  $\mu\text{L}$  das soluções de trabalho, de modo a obter a concentração de 500 ng/mL de cumarina, 7-hidroxycumarina, ácido *o*-cumárico e ácido *o*-hidroxifenilacético. Após a fortificação, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 3 minutos. Em seguida, alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  de metanol foram adicionadas aos tubos *Eppendorf*. As amostras foram novamente homogeneizadas com auxílio de vórtex por 3 minutos e então centrifugadas por 15 minutos (14000 rpm, 4°C, *Eppendorf* 5810R, Hamburgo, Alemanha). Por último, as amostras foram filtradas em filtro de poliéster (PET) Chromafil Xtra com 25 mm de diâmetro e tamanho de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha).

Para o teste de ultracentrifugação direta da amostra (sem o uso de metanol), alíquotas de 800  $\mu\text{L}$  de branco de urina foram transferidas para tubos *Eppendorf*, e em seguida fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  das soluções de trabalho, de modo a obter as mesmas concentrações do ensaio anterior. Após a fortificação, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 3 minutos e então centrifugadas por 15 minutos (14000 rpm, 4°C). Por último, as amostras foram filtradas em filtro de PET, com 25 mm de diâmetro e tamanho de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ .

### 3.5 COMPOSIÇÃO DA ESPECIALIDADE FARMACÊUTICA ADMINISTRADA AOS VOLUNTÁRIOS

As cápsulas de cumarina administradas aos voluntários foram preparadas no Centro de Estudos em Biofarmácia da UFPR (CEB-UFPR) com substância previamente pulverizada em grau e pistilo. Cerca de 500 mg do pó foram devidamente transferidos para cápsulas gelatinosas tamanho 0 (Extracaps, Genix Brasil) antes da administração da substância.

### 3.6 SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS, DELINEAMENTO DO ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE URINA

O estudo dos produtos de excreção da cumarina na urina de humanos contou com a participação de cinco voluntários (ambos os sexos, idade entre 23 e 37 anos) que compareceram voluntariamente ao CEB-UFPR após divulgação da pesquisa por meio eletrônico. Os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido após receberem informações sobre a condução dos procedimentos e sobre os benefícios e possíveis riscos relacionados ao estudo.

Foram considerados aptos a participar do estudo os voluntários que atendessem aos seguintes critérios:

- Ausência de antecedentes de hipersensibilidade à cumarina;
- Não estar fazendo uso de medicamentos;
- Ausência de patologias crônicas ou agudas;
- Voluntários do sexo feminino que não estivessem grávidas ou em período de amamentação.

Um dia antes do estudo, os voluntários iniciaram uma dieta com restrição a frutas, especiarias e demais alimentos que poderiam conter cumarina. Os voluntários foram orientados a comer, preferencialmente, pães, carnes e, como

bebida, consumir apenas água, para evitar ao máximo a exposição à cumarina por meio da dieta. Além disso, os voluntários também foram orientados a não utilizar cremes hidratantes e perfumes, pois é comum encontrar cumarina na composição de produtos cosméticos. Em seguida, os voluntários permaneceram em jejum por 8 horas e, após esse período, cada voluntário recebeu via oral uma dose única de 500 mg de cumarina. Os voluntários ingeriram a cápsula com o auxílio de 250 mL de água. As urinas foram coletadas nos tempos 0 (logo antes da ingestão da cápsula), tempo 1 (entre a tomada da cápsula e 1 hora após sua ingestão), tempo 2 (entre 1 e 2 horas), tempo 3 (entre 2 e 4 horas), tempo 4 (entre 4 e 8 horas), tempo 5 (entre 8 e 12 horas) e tempo 6 (entre 12 e 24 horas). As urinas foram armazenadas em frascos de plástico e congeladas a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Até a quarta hora após ingestão da cumarina, os voluntários permaneceram em jejum, sendo liberado o consumo apenas de água. Após esse período, foi permitido o consumo de alimentos, porém seguindo a mesma dieta iniciada no dia anterior. Vinte e quatro horas após a ingestão da cumarina, os voluntários voltaram às suas dietas normais.

Os protocolos experimentais deste estudo foram devidamente aprovados pelo Comitê de ética da Universidade Federal do Paraná (CEP/SCS CAAE 30401114.6.0000.0102, parecer 655.332).

### 3.7 PREPARO DA AMOSTRA

As amostras de urina dos voluntários (armazenadas a  $-40^{\circ}\text{C}$ ) foram descongeladas (temperatura ambiente) e aliquotadas (1 mL) em tubos *Eppendorf*. Em seguida, foram centrifugadas por 15 minutos (14000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e filtradas em filtro de PET. As amostras foram por fim diluídas 1:100 v/v com água ultrapurificada antes das injeções no cromatógrafo.

### 3.8 PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO DOS DADOS DO SOFTWARE METABOLYNX XS

Após as injeções das amostras dos voluntários no CLUE-EM e obtenção dos cromatogramas e espectros de massas, os metabólitos da cumarina foram identificados com o auxílio do *software* MetaboLynx XS. Os seguintes parâmetros para tratamento dos dados foram utilizados:

- Criação da lista de metabolizações esperadas:
  1. Nenhuma biotransformação, resultando na própria cumarina;
  2.  $-C+H_2O$  (massa de 6,0106 Da) resultando em ácido hidroxifenilacético;
  3.  $+O$  (massa de 15,9949 Da) resultando em hidroxycumarina;
  4.  $+H_2O$  (massa de 18,0106 Da) resultando em ácido cumárico;
  5.  $+C_6H_8O_7$  (massa de 192,0270 Da) resultando em hidroxycumarina glucoronida;
  6.  $+SO_4$  (massa de 95,9517 Da) resultando em hidroxycumarina sulfatada.
- Filtro por defeito de massa de 25 mDa;
- Processamento de metabólitos de fase I e fase II;
- Massas idênticas (janela de 0,02 Da) encontradas no controle e na amostra no mesmo tempo de retenção (intervalo de tempo de retenção de 0,1 minuto) foram desconsideradas, exceto aquelas massas cuja intensidade do metabólito fosse 3 vezes maior do que a do controle;
- Variações de 1, 2, 3 ou 4 Da na massa de um íon, quando no mesmo tempo de retenção, seriam consideradas como variação isotópica;
- Relato dos picos falso-positivos como indesejáveis;
- Separação de pico mínima de 0,02 Da com subtração do *background* adjacente ao pico;
- Utilização do espectro com massa exata (aqueles que foram corrigidos pelo *lockspray* e que não sofreram interferência de saturação do detector);
- Demonstração dos cromatogramas dos metabólitos esperados com janela restritiva de massa de 0,020 Da;

- Integração através do *ApexTrack* e *threshold* de área absoluta de 10 sem aplicação de suavização tanto para os metabólitos esperados como para os não esperados;
- Demonstração dos cromatogramas para os metabólitos não esperados, com janela restritiva de massas no intervalo de -50 a +300 Da em relação à massa da cumarina (para amostra e controle).
- Relato dos picos dos possíveis metabólitos juntamente com o controle correspondente;
- Parâmetros de composição elementar definidos como massa no modo monoisotópico, número de elétrons par e tolerância de 10 ppm.
- Possível presença dos seguintes átomos na estrutura dos metabólitos: carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio e enxofre.

### 3.9 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DA CUMARINA

#### 3.9.1 Coleta dos picos cromatográficos através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução

O desenvolvimento do método para coleta dos picos referentes aos principais metabólitos da cumarina foi realizado em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência da Agilent 1200 (Wilmington, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems, Toronto, Canadá) e fonte de ionização por *electrospray*. Os seguintes parâmetros foram definidos:

- Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila/água 95:5 v/v, ambos contendo 0,5 mmol/L de formiato de amônio, eluída em modo gradiente a 1,0 mL/min conforme segue: Tempo 0 a 15,0 min: A=95 a 85%; Tempo 15,1 a 25,0 min: A=85%; Tempo 25,1 a 60 min: A=95%.
- Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C8, 250 x 4,6 mm, partículas de 5,0 µm (Agilent, EUA);

- Temperatura de forno da coluna: 30°C;
- Volume de injeção: 50 µL;
- Modo de ionização: negativo;
- Parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar: -4500 V, temperatura: 550°C, gás de interface: 18 psi, gás de colisão: 6 psi, gás de nebulização: 50 psi e gás auxiliar: 50 psi;
- Aquisição dos dados: monitoramento de reações múltiplas com velocidade de aquisição dos dados de 400 ms;
- Parâmetros individuais e transições monitoradas de cada composto: de acordo com o descrito na Tabela 1.

**TABELA 1 – ÍONS MOLECULARES, PARÂMETROS INDIVIDUAIS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS E TRANSIÇÕES MONITORADAS DE METABÓLITOS DA CUMARINA ENCONTRADOS NA URINA DOS VOLUNTÁRIOS**

<b>Composto</b>	<b>Íon molecular (m/z)</b>	<b>Transições (m/z)</b>	<b>CE<sup>a</sup> (V)</b>	<b>CEP<sup>b</sup> (V)</b>	<b>CXP<sup>c</sup> (V)</b>	<b>DP<sup>d</sup> (V)</b>	<b>EP<sup>e</sup> (V)</b>
Hidroxicumarina glucoronida	337,1	337,1 → 161,0	-25	-17,3	-4	-30	-5
Hidroxicumarina sulfatada	241,0	241,0 → 161,0	-25	-13,5	-4	-30	-5
Di-hidroxicumarina sulfatada	257,0	257,0 → 177,0	-25	-14,2	-4	-30	-6,5

<sup>a</sup>CE, energia de colisão; <sup>b</sup>CEP, potencial de entrada na cela de colisão; <sup>c</sup>CXP, potencial de saída da cela de colisão; <sup>d</sup>DP, potencial de desagrupamento; <sup>e</sup>EP, potencial de entrada

Foi selecionado o intervalo de coleta de urina de 1 a 2 horas após a ingestão da cumarina para a realização desse ensaio, pois todos os metabólitos foram encontrados com intensidade de sinal elevada nesse tempo. As amostras de urina foram preparadas de modo igual às injetadas no CLUE-EM, conforme descrito no item 3.7. Foram realizadas diversas corridas cromatográficas até terem sido coletados cerca de 15 mL referentes à cada pico cromatográfico de interesse, os quais foram evaporados em concentrador de amostras (45°C, CentriVap Labconco, Kansas City, EUA) e ressuspensos em 500 µL de metanol.

### 3.9.2 Cromatografia em camada delgada

Os ensaios de cromatografia em camada delgada foram realizados em placas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência e camada de 0,20 mm (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). O revelador foi solução etanólica de KOH a 10% *p/v* (WAGNER; BLADT, 1996). As manchas das cumarinas foram observadas sob luz UV no comprimento de 365 nm.

### 3.9.3 Cromatografia em coluna

A cromatografia foi realizada em coluna de vidro de 30 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro. Como fase estacionária, foi utilizada sílica gel 60, 220-440 *mesh flash* (Fluka, Steinheim, Suíça). As amostras de urina, para serem compatíveis com o sistema de cromatografia em coluna, foram submetidas a um processo de liofilização a -80°C e pressão de 70 mTorr (SP Scientific, Gardiner, EUA). Aproximadamente 2,5 g de amostra liofilizada foram misturados com uma pequena quantidade de sílica antes de serem colocados no topo da coluna de vidro. As fases móveis utilizadas foram compostas por acetato de etila:metanol:água (20:2:1 *v/v/v*) (utilizada na cromatografia em modo isocrático) e acetato de etila:metanol:água (10:2:1 *v/v/v*) e acetato de etila:metanol:água (8:4:1 *v/v/v*) (utilizadas na cromatografia em modo gradiente).

Para acompanhar quais substâncias se encontravam presentes em cada uma das frações coletadas, estas foram evaporadas no concentrador de amostra a 45°C por 60 minutos, até que o conteúdo das frações fosse reduzido a aproximadamente 2 mL, e então diluídas na proporção 1:75 *v/v* com água ultrapurificada e injetadas no CLUE-EM.

### 3.9.4 Análises por Ressonância Magnética Nuclear

Para a elucidação estrutural dos principais metabólitos da cumarina, foram realizados experimentos de Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$ , COSY (*Correlation Spectroscopy*) e HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*), via aparelho da Bruker Avance III 600 operando na frequência base de 600,13 MHz para os núcleos de  $^1\text{H}$  e de 150,90 MHz para os núcleos de  $^{13}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram relatados em partes por milhão (ppm) relativos ao padrão interno acetona em 2,225 e 30,20 ppm para os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente.

Os metabólitos isolados foram solubilizados em solvente deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ ) e colocados em tubos de 5 mm de diâmetro para análise à temperatura de 30°C. Os espectros foram analisados com auxílio do *software* TOPSPIN 3.1 da Bruker.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLUE-EM

A primeira etapa para o desenvolvimento do método por CLUE-EM foi a escolha da fonte de ionização do espectrômetro de massas. Em nosso estudo, a fonte escolhida foi a *electrospray* em virtude das atribuições de robustez, sensibilidade, capacidade de trabalhar com matrizes complexas e alta performance na ionização de compostos.

A próxima etapa foi a verificação do sinal dos analitos. Neste ensaio, soluções de trabalho contendo 300 ng/mL dos analitos foram preparadas e infundidas a 10  $\mu$ L/min no espectrômetro de massas. Foram avaliados o modo de ionização e a intensidade e estabilidade do sinal.

O modo positivo de ionização foi o mecanismo mais eficiente para ionizar a cumarina ( $m/z = 147,0446$ ) enquanto que o modo negativo de ionização foi o mais eficiente para ionizar o ácido *o*-cumárico ( $m/z = 163,0395$ ) e o ácido *o*-hidroxifenilacético ( $m/z = 151,0395$ ). Apesar de a 7-hidroxycumarina ionizar tanto no modo negativo ( $m/z = 161,0239$ ) como no positivo ( $m/z = 163,0395$ ), os sinais mais intensos foram obtidos no modo negativo.

Ainda durante a infusão, alguns parâmetros foram otimizados a fim de obter as maiores intensidades de sinal, como os parâmetros da fonte de ionização e o tipo e a concentração do aditivo. Os aditivos testados foram ácido fórmico (0,05%, 0,1% e 0,2%), formiato de amônio (0,1 mmol/L, 1 mmol/L, 2 mmol/L e 3 mmol/L) e mistura de ácido fórmico e formiato de amônio (0,1% e 1 mmol/L, respectivamente). Dentre estes aditivos, o que apresentou os sinais mais intensos foi o formiato de amônio na concentração de 0,1 mmol/L.

Foram testadas várias voltagens de capilar, *sampling cone* e *source offset*. As voltagens do capilar escolhidas foram de -2200 V para o modo negativo de ionização e +2800 V para o modo positivo. Os parâmetros *sampling cone* e *source offset* foram mantidos em 15 V e 10 V respectivamente, para minimizar a fragmentação molecular na fonte de ionização, observada quando utilizados valores

mais altos. Ainda durante a infusão, variou-se a temperatura de dessolvatação e o fluxo dos gases de dessolvatação e do cone. A temperatura de dessolvatação foi definida em 450° C para o modo positivo de ionização e 350°C para o modo negativo de ionização. O fluxo do gás de dessolvatação foi mantido em 600 L/h para o modo positivo de ionização e 550 L/h para o modo negativo. O fluxo do gás do cone foi definido em 50 L/h para ambos os modos de ionização. A temperatura da fonte de ionização foi mantida a 150°C por recomendação do fabricante.

Após encerrada a fase de checagem e otimização do sinal dos analitos, partiu-se para o desenvolvimento do método cromatográfico. Os testes foram conduzidos com soluções de trabalho preparadas nas concentrações de 10, 100, 250 e 500 ng/mL.

Para compor a fase móvel, foram testados água, metanol e acetonitrila, mantendo em todos os ensaios a concentração de aditivo em 0,1 mmol/L (formiato de amônio). Contudo, foi observado que o uso de formiato de amônio nessa concentração prejudicava o perfil do pico do ácido *o*-cumárico (arraste do analito), problema que foi resolvido quando a concentração de aditivo foi aumentada para 0,5 mmol/L. Observou-se também que ao utilizar metanol na fase móvel, durante toda a corrida cromatográfica apareciam fragmentos característicos de formiato de sódio, que poluíam o espectro. Possivelmente, íons sódio presentes no metanol reagiram com o formiato de amônio (aditivo) resultando no formiato de sódio observado. A marca do metanol foi substituída e o mesmo efeito continuou sendo observado. Desta forma, optou-se pela utilização de acetonitrila como fase modificadora.

Foram testadas diferentes temperaturas de forno da coluna (40°C, 45°C e 50°C) e como nenhuma mudança significativa no formato dos picos foi observada, a temperatura de 50°C foi escolhida. Temperaturas mais altas diminuem a viscosidade da fase móvel, e a menor viscosidade do eluente resulta numa diminuição da pressão do sistema, possibilitando o emprego de fluxos maiores. Quanto maior o fluxo, mais rápida a corrida cromatográfica e, desta forma, o fluxo de 450 µL/min foi utilizado.

Durante os testes com o gradiente da fase móvel também foi observado que quando a proporção de fase orgânica atingia cerca de 50%, todos os analitos já haviam sido eluídos. Esse fato possibilitou análises com baixo consumo de solvente

orgânico. Além disso, o método apresentou como vantagem um tempo de corrida curto (8,70 min) considerando a complexidade da matriz e o tipo de análise conduzida (*screening*). O cromatograma contendo os padrões após a definição dos parâmetros cromatográficos e espectrométricos pode ser observado na Figura 9.

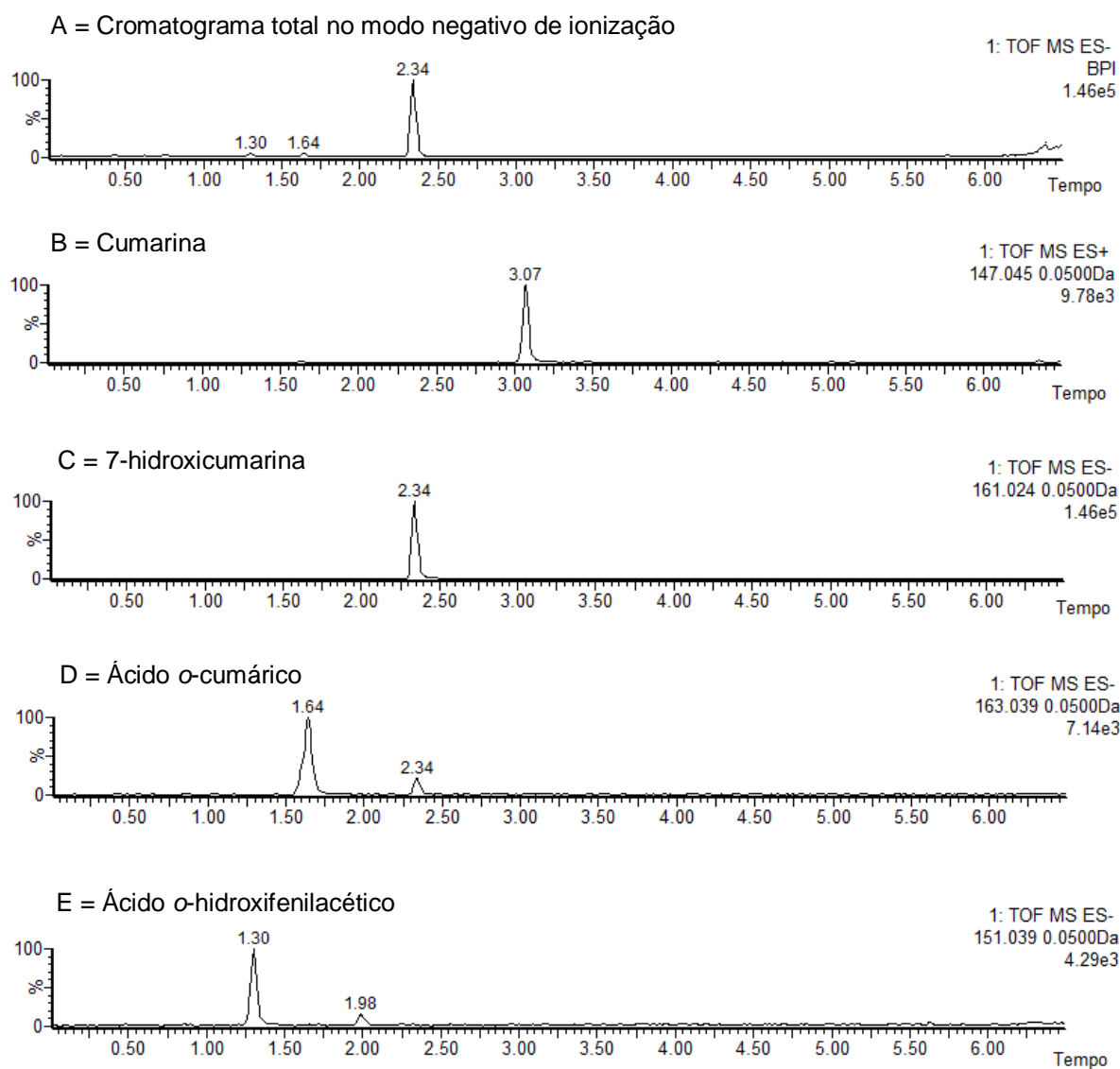


FIGURA 9 – CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES EM SOLUÇÃO (250 NG/ML) APÓS OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS E ESPECTROMÉTRICOS

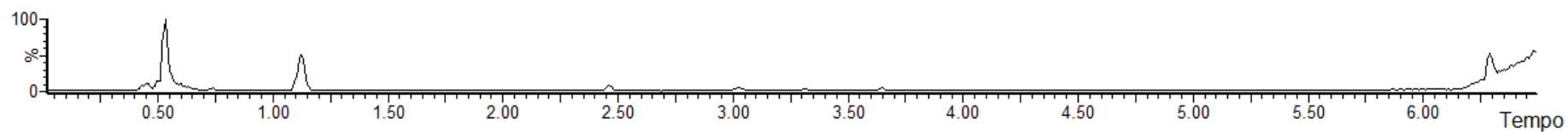
## 4.2 TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE PREPARO DA AMOSTRA

Em relação aos testes conduzidos para avaliar a melhor forma de preparo da amostra, o processo com adição de metanol resultou no aparecimento dos picos cromatográficos dos padrões com uma intensidade ligeiramente menor de sinal. Dessa forma, a ultracentrifugação direta da urina (sem adição de metanol) seguida de filtração foi escolhida como forma de preparo da amostra, pois, além de reduzir o tempo de manuseio, assegura que nenhum metabólito seja perdido devido à ausência ou afinidade reduzida ao solvente de extração.

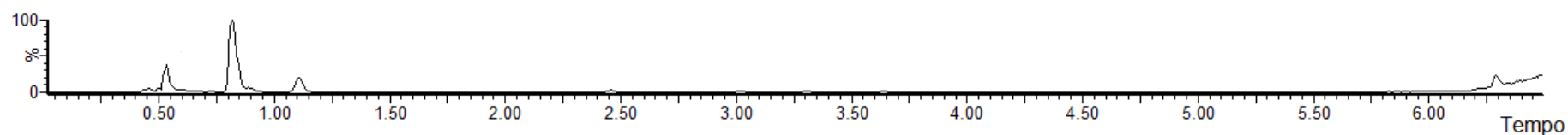
## 4.3 AQUISIÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE DOS METABÓLITOS DA CUMARINA UTILIZANDO O SOFTWARE METABOLYNX

Após a etapa de pré-tratamento da amostra, a urina coletada dos voluntários foi injetada no CLUE-EM. Os cromatogramas de cada voluntário, em cada período de coleta (zero hora, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas e 24 horas após a administração da cumarina) foram armazenados para posterior análise via *software* MetaboLynx. Um exemplo de cromatograma obtido para a amostra biológica no tempo zero e no tempo 1 (urina coletada antes da administração da cumarina e 1 hora após a ingestão) é apresentado na Figura 10.

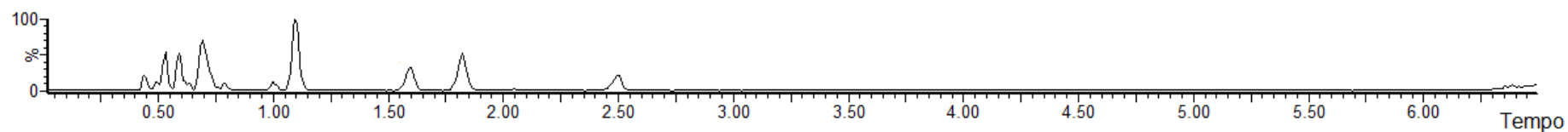
A = Tempo 0, modo positivo de ionização



B = Tempo 1, modo positivo de ionização



C = Tempo 0, modo negativo de ionização



D = Tempo 1, modo negativo de ionização

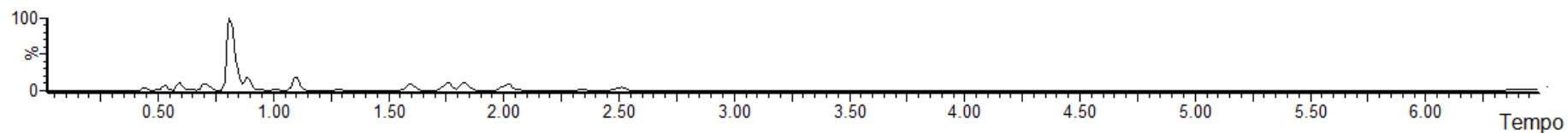


FIGURA 10 – CROMATOGRAMAS DAS URINAS DE UM DOS VOLUNTÁRIOS OBTIDAS NO TEMPO ZERO E UMA HORA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE 500 MG DE CUMARINA

O *software* MetaboLynx gerou uma lista com os possíveis metabólitos da cumarina encontrados na urina dos voluntários. No entanto, foi observado que após o processamento dos dados um número muito elevado de potenciais metabólitos foi obtido (Tabelas 2 e 3), o que levou a crer em uma possível presença de resultados falso-positivos. Dessa forma, foram realizadas duas etapas de triagem para eliminar estes resultados falsos. Na primeira triagem, os resultados foram filtrados utilizando os seguintes parâmetros:

- Apresentação apenas dos metabólitos (esperados e não esperados) que apresentassem intensidade relativa de no mínimo 0,02%;
- Intervalo de tempo de corrida de 0 a 5 minutos para apresentação dos metabólitos (após esse tempo começava a limpeza da coluna).

Também foi realizada uma triagem visual para eliminar os íons que claramente faziam parte do ruído cromatográfico, mesmo aqueles cuja intensidade relativa era maior do que 0,02%. O número de candidatos a metabólitos restantes após a primeira triagem está apresentado nas Tabela 2 e 3

**TABELA 2 - NÚMERO DE POSSÍVEIS METABÓLITOS ENCONTRADOS PELO SOFTWARE METABOLYNX EM FUNÇÃO DO TEMPO DE COLETA DE URINA APÓS A PRIMEIRA ETAPA DE TRIAGEM PARA ELIMINAÇÃO DE RESULTADOS FALSO-POSITIVOS (MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO)**

<b>Voluntário</b>	<b>0-1 h</b>	<b>1-2 h</b>	<b>2-4 h</b>	<b>4-8 h</b>	<b>8-12 h</b>	<b>12-24 h</b>
<b>1</b>	20/133	7/98	28/168	40/171	45/195	23/183
<b>2</b>	20/276	5/161	17/184	28/248	24/272	27/315
<b>3</b>	12/171	6/94	34/194	60/219	38/217	62/266
<b>4</b>	6/125	17/137	67/181	87/221	50/172	87/225
<b>5</b>	37/193	12/89	9/78	16/148	39/226	41/251

Dados: resultados apresentados como número de potenciais metabólitos após a primeira triagem em relação ao número inicial de potenciais metabólitos fornecido pelo *software*.

**TABELA 3 - NÚMERO DE POSSÍVEIS METABÓLITOS ENCONTRADOS PELO SOFTWARE METABOLYNX EM FUNÇÃO DO TEMPO DE COLETA DE URINA APÓS A PRIMEIRA ETAPA DE TRIAGEM PARA ELIMINAÇÃO DE RESULTADOS FALSO-POSITIVOS (MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO)**

Voluntário	0-1 h	1-2 h	2-4 h	4-8 h	8-12 h	12-24 h
1	27/163	10/104	38/181	39/173	49/188	43/165
2	41/318	8/114	28/210	27/177	29/255	22/234
3	25/162	10/117	38/199	43/201	46/202	38/199
4	18/136	13/121	38/213	46/220	25/157	33/212
5	35/220	8/99	12/109	13/163	25/233	26/208

Dados: resultados apresentados como número de potenciais metabólitos após a primeira triagem em relação ao número inicial de potenciais metabólitos fornecido pelo *software*

Na segunda triagem, foi verificado manualmente se os possíveis metabólitos apareciam na urina de pelo menos quatro dos cinco voluntários e se o tempo de retenção do íon era constante (se um íon aparece em tempos de retenção diferentes em voluntários diferentes, não se trata da mesma substância). Ao término do processamento dos dados, foram encontrados 12 metabólitos da cumarina na urina dos voluntários. A Tabela 4, contendo a massa neutra, o modo de ionização, o tempo de retenção da substância e a metabolização ocorrida sugerida pelo *software*, é apresentada abaixo.

**TABELA 4 – MASSA NEUTRA, MODO DE IONIZAÇÃO, TEMPO DE RETENÇÃO E METABOLIZAÇÃO OCORRIDA NA CUMARINA APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL EM HUMANOS**

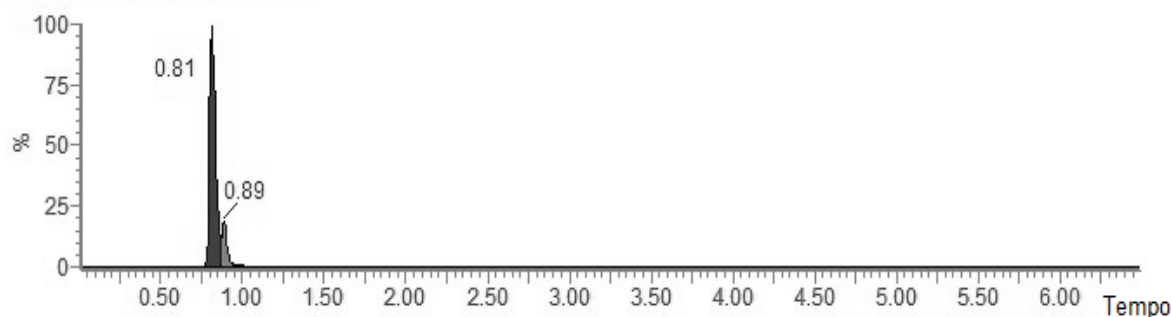
Metabólitos	Massa neutra (Da)	Modo de ionização	Tempo de retenção aproximado (min)	Metabolização ocorrida sugerida pelo <i>software</i>
M1 e M2	338,0638	+ e -	0,81 e 0,89	Hidroxilação + conjugação com ácido glicurônico
M3 e M4	241,9885	+ e -	1,70 e 1,94	Hidroxilação + sulfatação
M5	162,0317	-	2,34	Hidroxilação
M6 e M7	257,9834	-	1,51 e 1,99	Duas hidroxilações + sulfatação
M8	152,0473	-	1,25	(Demetilação + hidroxilação) + duas reduções
M9	354,0587	-	0,93	Duas hidroxilações + conjugação com ácido glicurônico
M10	297,0671	+ e -	1,27	Redução + (hidroxilação + metilação) + conjugação com S-cisteína
M11	368,0743	+ e -	0,91	(Hidroxilação + metilação) + (hidroxilação + conjugação com ácido glicurônico)
M12	307,0514	+	2,47	Conjugação com N-acetilcisteína

Dados: modo positivo de ionização (+); modo negativo de ionização (-)

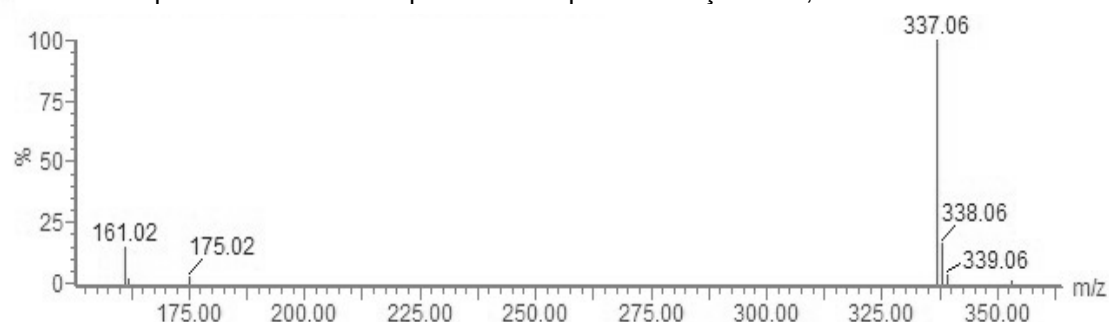
Após o *software* reconhecer a presença de uma massa que se encaixasse nos parâmetros estabelecidos, um cromatograma contendo os picos referentes à massa do possível metabólito era gerado. Por exemplo, a Figura 11A mostra o cromatograma referente à  $m/z$  337,06 (modo negativo de ionização). Pode ser observado que foram encontrados dois picos cromatográficos referentes a esse íon, o primeiro no tempo de retenção de 0,81 min e o segundo no tempo de 0,89 min. Em seguida, o *software* gerou os espectros de massas extraídos de cada um destes picos cromatográficos, como, por exemplo, a Figura 11B, que representa o espectro de massas referente ao pico em 0,81 minutos. Por fim, o *software* procurou por esse mesmo íon no cromatograma do controle (branco de urina) e, como pode ser observado na Figura 11C, nos tempos de retenção em que foi encontrado o íon com  $m/z$  337,06 na amostra, nada apareceu no controle. Por isso, nenhum espectro de massas foi extraído. Desta forma, fica claro que esse íon representa um metabólito da cumarina, pois essa substância apareceu na urina dos voluntários somente após ingestão da droga.



A = Cromatograma do metabólito da cumarina com  $m/z$  337,06



B = Espectro de massas do pico com tempo de retenção de 0,81 min



C = Cromatograma do íon com  $m/z$  337,06 extraído do controle (branco de urina)

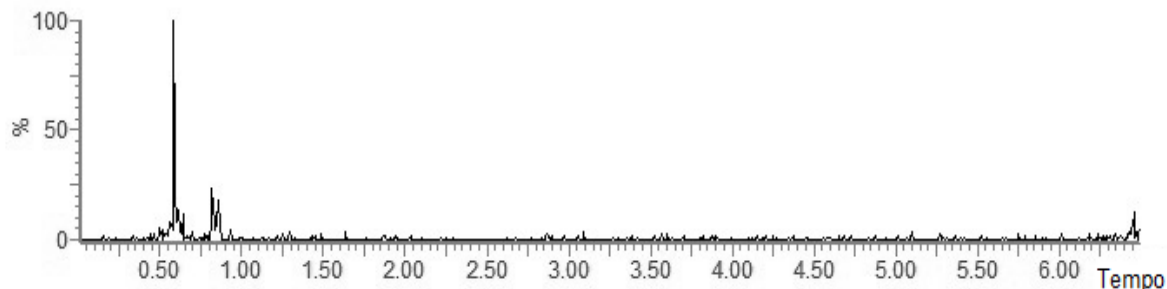


FIGURA 11 – CROMATOGRAMAS E ESPECTRO DE MASSAS DO SINAL  $M/Z$  337,0638 DA (MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO) GERADOS PELO SOFTWARE METABOLYNX A PARTIR DE DADOS COLETADOS DE UMA AMOSTRA DE URINA APÓS INGESTÃO DE CUMARINA E DE UMA AMOSTRA DE URINA CONTROLE

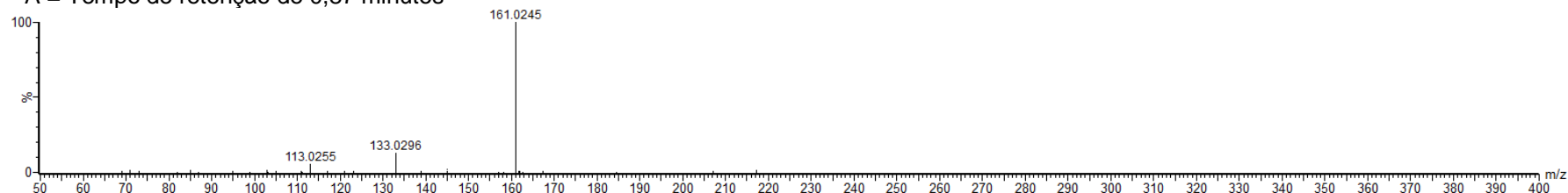
Dentre os 12 metabólitos encontrados, as estruturas da 7-hidroxycumarina (M5) e do ácido *o*-hidroxifenilacético (M8) foram confirmadas pela comparação cromatográfica com os padrões analíticos.

Conforme demonstrado na Tabela 4, os compostos M1 e M2 apresentam massas idênticas em tempos de retenção diferentes. O mesmo também foi observado para os compostos M3, M4 e M6, M7. Esses resultados indicam que, embora tenham exatamente a mesma massa molecular, não se tratam da mesma

substância, pois tempo de retenção diferente significa polaridade diferente. Portanto tratam-se, na verdade, de metabólitos isômeros.

Mediante esse resultado, apenas com a massa exata não foi possível afirmar em que posição da molécula a biotransformação ocorreu, ou seja, se a hidroxilação seguida de sulfatação, por exemplo, ocorreu na posição 6 ou 7 ou 8 da cumarina e assim por diante. Na tentativa de elucidar a estrutura dos isômeros, foram realizados experimentos de fragmentação de massas (MS/MS) com rampa de energia de colisão de 20 a 60 V com o objetivo de encontrar uma possível diferença no perfil de fragmentação entre os metabólitos isômeros. Porém, como pode ser observado na Figura 12, em que são apresentados os isômeros que sofreram hidroxilação seguida de conjugação ao ácido glicurônico (M1 e M2), os fragmentos são exatamente os mesmos, sendo o principal  $m/z$  161,02, que corresponde à perda da porção glucoronida da molécula. Esse fato pode ser melhor visualizado na Figura 13, na qual é apresentado o espectro de fragmentação ampliado.

A = Tempo de retenção de 0,87 minutos



B = Tempo de retenção de 0,81 minutos

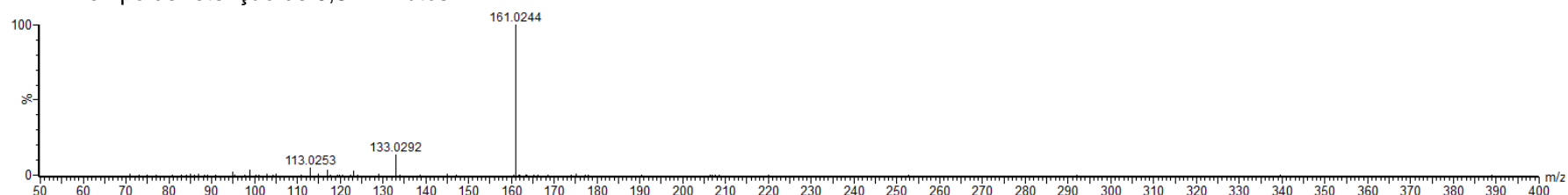
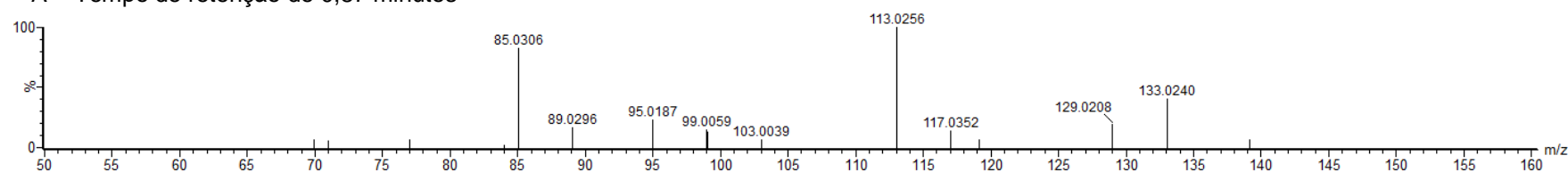


FIGURA 12 – ESPECTROS DE FRAGMENTAÇÃO DOS ISÔMEROS DE  $M/Z$  337,06 CORRESPONDENTES À BIOTRANSFORMAÇÃO DA CUMARINA EM HIDROXICUMARINA GLUCORONIDA. Dados: rampa de energia de colisão de 20 a 60 V, modo negativo de ionização

A = Tempo de retenção de 0,87 minutos



B = Tempo de retenção de 0,81 minutos

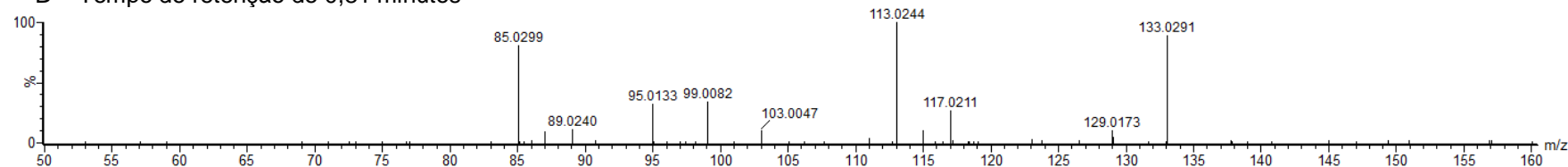


FIGURA 13 – AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE FRAGMENTAÇÃO DOS ISÔMEROS DE  $M/Z$  337,06 CORRESPONDENTES À BIOTRANSFORMAÇÃO DA CUMARINA EM HIDROXICUMARINA GLUCORONIDA. Dados: rampa de energia de colisão de 20 a 60 V, modo negativo de ionização

Apesar de não ser possível afirmar com clareza em qual posição da cumarina as hidroxilações seguidas de conjugações ao ácido glicurônico ocorreram (M1 e M2), é sabido que a 7-hidroxicumarina glucoronida é o principal metabólito da cumarina encontrado na urina de humanos (LACY; O'KENNEDY, 2004). Desta forma, é esperado que o pico cromatográfico mais intenso encontrado em nosso estudo (M1) corresponda a essa substância (Figura 14).

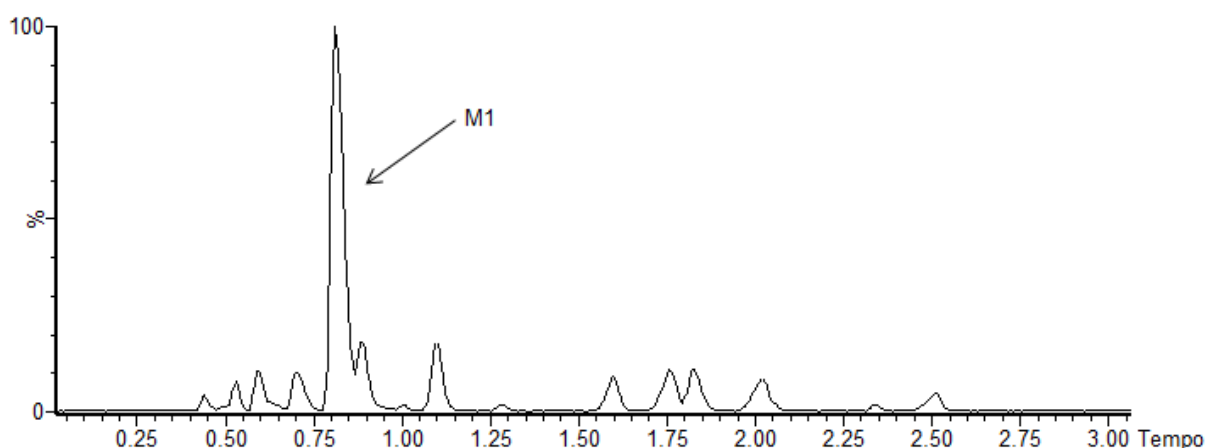


FIGURA 14 - CROMATOGRAMA TOTAL DA URINA DE UM DOS VOLUNTÁRIOS COLETADA NO TEMPO DE 1 HORA APÓS INGESTÃO DE 500 MG DE CUMARINA EVIDENCIANDO O M1 (7-HIDROXICUMARINA GLUCORONIDA)

Em relação ao outro isômero hidroxilado e glucorinado da cumarina (M2), como o espectro de fragmentação é muito similar ao M1 (fragmentos idênticos e com intensidades relativas muito próximas), estima-se que as biotransformações tenham ocorrido no anel aromático (nas posições 5, 6 ou 8), pois se a hidroxilação ocorresse no anel lactona (posições 3 ou 4), seriam esperados fragmentos de massas distintos entre os isômeros, devido à proximidade do oxigênio oriundo da biotransformação aos outros oxigênios já presentes na estrutura da cumarina (Figura 15).

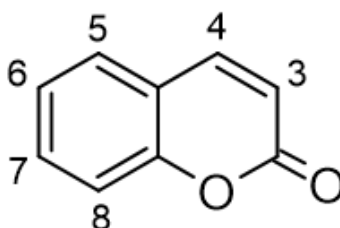


FIGURA 15 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CUMARINA EVIDENCIANDO OS POSSÍVEIS SÍTIOS DE SUBSTITUIÇÃO

A mesma situação de perfil semelhante de fragmentação foi constatada para as biotransformações hidroxilação seguida de sulfatação (M3 e M4) e duas hidroxilações seguidas de uma sulfatação (M6 e M7). Até o presente momento, a literatura relatava apenas a via da hidroxilação da cumarina na posição 7 em humanos, mas os nossos resultados indicam claramente que essa não é a única rota de hidroxilação dessa substância *in vivo*. Esse fato nos mostrou a necessidade de análises confirmatórias para a completa elucidação estrutural destes isômeros.

Não há relatos na literatura científica da presença na urina de humanos ou de cobaias das biotransformações duas hidroxilações seguida de conjugação ao ácido glicurônico (M9), redução + (hidroxilação + metilação) + conjugação com S-cisteína (M10) e (hidroxilação + metilação) + (hidroxilação + conjugação com ácido glicurônico) (M11) após a ingestão da cumarina.

Outro resultado não encontrado na literatura foi a presença de cumarina ligada a N-acetilcisteína (M12) na urina humana. Huwer e colaboradores (1990) relataram ter encontrado N-acetil-S-(3-cumarinil)-cisteína (também denominado de ácido 3-mercaptúrico da cumarina) na urina de ratos que haviam recebido cumarina. Porém, em nosso estudo não foi possível afirmar através do *software* em qual posição da cumarina se liga a N-acetilcisteína (Figura 16).

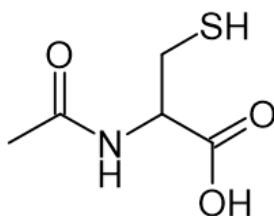


FIGURA 16 – ESTRUTURA QUÍMICA DA N-ACETILCISTEÍNA

Em relação ao ácido *o*-cumárico, embora altos níveis tenham sido encontrados no plasma de humanos que receberam doses superiores a 100 mg de cumarina por Gasparetto (2013), essa substância não foi detectada na urina dos voluntários. Esse resultado indica que o ácido *o*-cumárico sofre nova biotransformação antes de ser excretado na urina. Pela semelhança estrutural, apenas o ácido *o*-hidroxifenilacético entre os metabólitos encontrados poderia ser um candidato a metabólito do ácido *o*-cumárico (BOOTH *et al.*, 1959).

#### 4.4 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DA CUMARINA

##### 4.4.1 Coleta dos picos cromatográficos através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de baixa resolução

A primeira etapa para confirmação estrutural de alguns dos metabólitos da cumarina foi a obtenção dessas substâncias na forma mais pura possível. Para tal, um método por CLAE-EM para a coleta dos picos cromatográficos referentes aos principais metabólitos da cumarina foi desenvolvido. Foram considerados como metabólitos principais aqueles cujos picos cromatográficos podiam ser facilmente visualizados no cromatograma total de urina, sem o auxílio de extração da massa ou do *software* MetaboLynx (M1, M2, M3 e M4) (Figura 17). Os outros picos presentes nesse cromatograma, com exceção do pico da 7-hidroxycumarina (Tr de 2,34 minutos) não correspondem a metabólitos da cumarina.

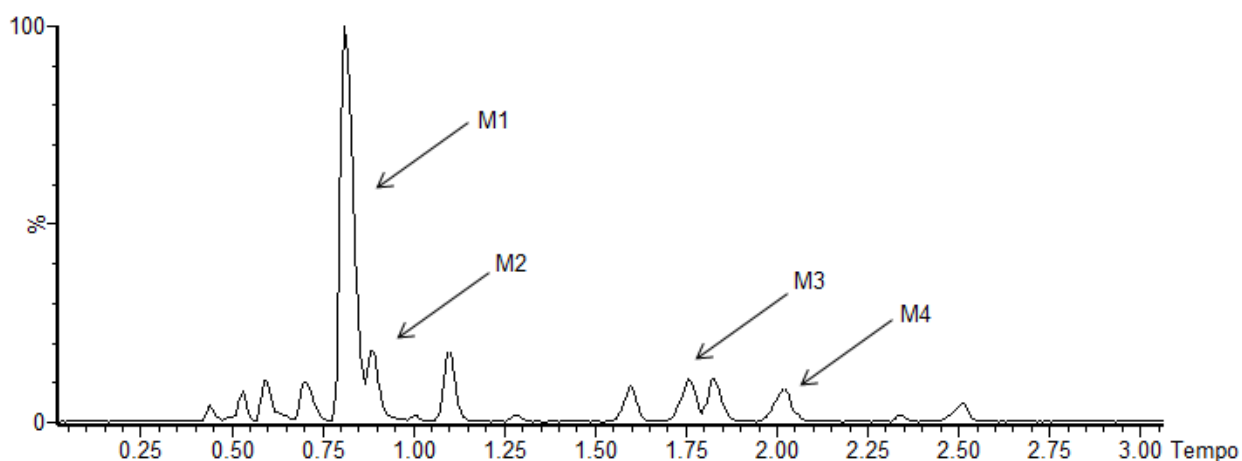


FIGURA 17 - CROMATOGRAMA TOTAL DA URINA DE UM DOS VOLUNTÁRIOS COLETADA NO TEMPO DE 1 HORA APÓS INGESTÃO DE 500 MG DE CUMARINA, DEMONSTRANDO QUAIS FORAM CONSIDERADOS OS PRINCIPAIS METABÓLITOS DA CUMARINA

Para que os metabólitos da cumarina fossem coletados com alta pureza, era necessário que o método desenvolvido permitisse a separação total dos picos cromatográficos. Isso impediria a contaminação das substâncias alvo por outras com polaridade semelhante. Esta etapa foi realizada em um sistema CLAE e não CLUE

porque na CLAE as colunas utilizadas apresentam maior comprimento, diâmetro e tamanho de partícula, permitindo a injeção de uma quantidade maior de amostra e, conseqüentemente, uma maior recuperação.

Como era sabido que os principais metabólitos da cumarina apresentavam alta polaridade, o método foi desenvolvido utilizando um gradiente de fase móvel contendo uma grande proporção de fase aquosa. Outro detalhe é que foram necessários 35 min para reequilíbrio da coluna. Embora extenso, esse tempo foi essencial para garantir a reprodutibilidade do tempo de retenção dos picos cromatográficos, tornando viável o procedimento de coleta.

O tempo de retenção de cada pico foi anotado: M1 (6,10-6,90 min), M2 (7,20-7,55 min), M3 (13,45-14,00 min) e M4 (15,00-15,80 min), e por fim o cromatógrafo foi desacoplado do espectrômetro de massas e os picos foram coletados. O cromatograma utilizado como referência para a coleta dos picos está representado na Figura 18.

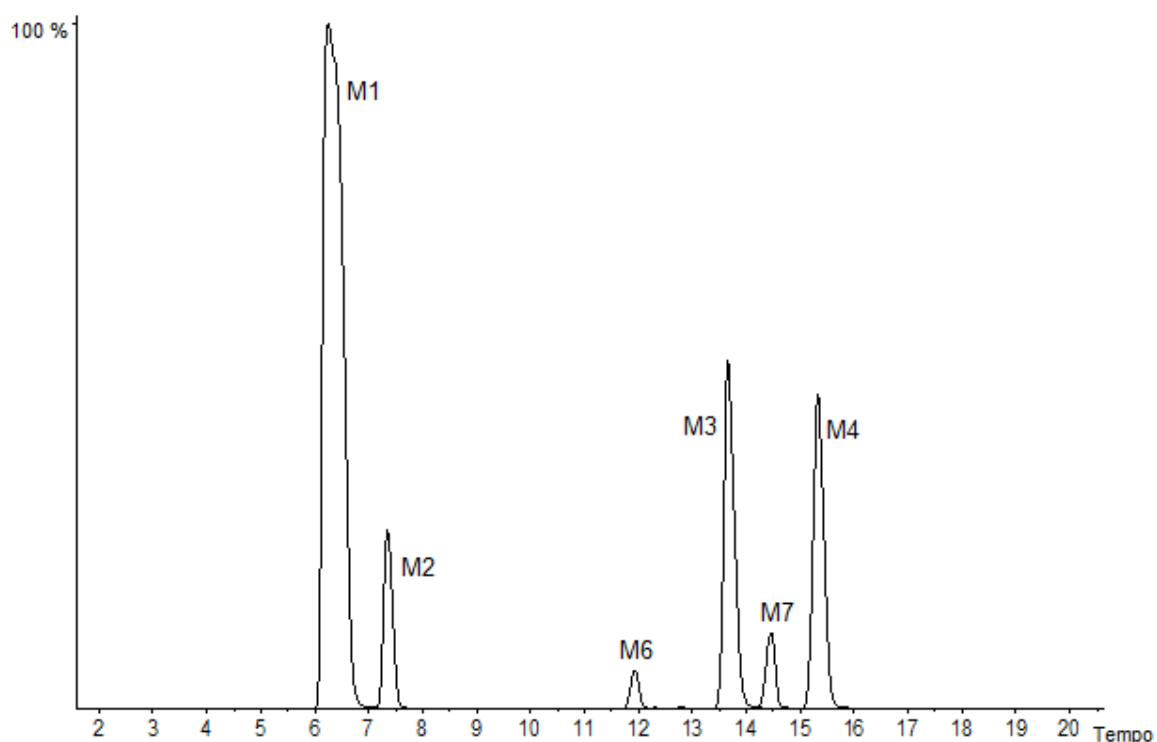


FIGURA 18 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE-EM PARA A COLETA DOS PICOS DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS DA CUMARINA ENCONTRADOS NA URINA HUMANA (M1, M2, M3 E M4) A PARTIR DA URINA COLETADA ENTRE 1 E 2 HORAS

Foram coletados cerca de 15 mL relativos à cada pico ao longo de diversas corridas cromatográficas, os quais foram evaporados em concentrador de amostras. Porém, apesar dos esforços, a quantidade recuperada de amostra foi baixa para que a elucidação estrutural dos isômeros pudesse ser realizada por RMN. Entretanto, a obtenção das substâncias isoladas nessa etapa foi essencial para os procedimentos seguintes de isolamento e purificação da amostra, principalmente para a análise por cromatografia em camada delgada.

#### 4.4.2 Cromatografia em camada delgada

A fim de obter uma quantidade maior dos principais metabólitos da cumarina para a confirmação estrutural, o próximo passo foi encontrar uma fase móvel adequada para separar os grupos de metabólitos glucorinados (M1 e M2) dos sulfatados (M3 e M4) por cromatografia em coluna. Para tal, as substâncias isoladas por CLAE foram aplicadas em placas de sílica para cromatografia em camada delgada, sendo testadas as fases móveis acetato de etila:metanol:água nas proporções de 20:2:1 v/v/v e de 10:2:1 v/v/v. Após revelação com solução etanólica de KOH 10% *p/v*, puderam ser observadas sob luz UV (365 nm) manchas esverdeadas, características de cumarinas (Figura 19). Com as duas composições de fase móvel testadas foi possível observar que os grupos de substâncias apresentam tempos de retenção bem distintos (Figura 19), o que tornou possível a utilização de ambas as fases móveis para isolamento dos principais metabólitos da cumarina por cromatografia em coluna.



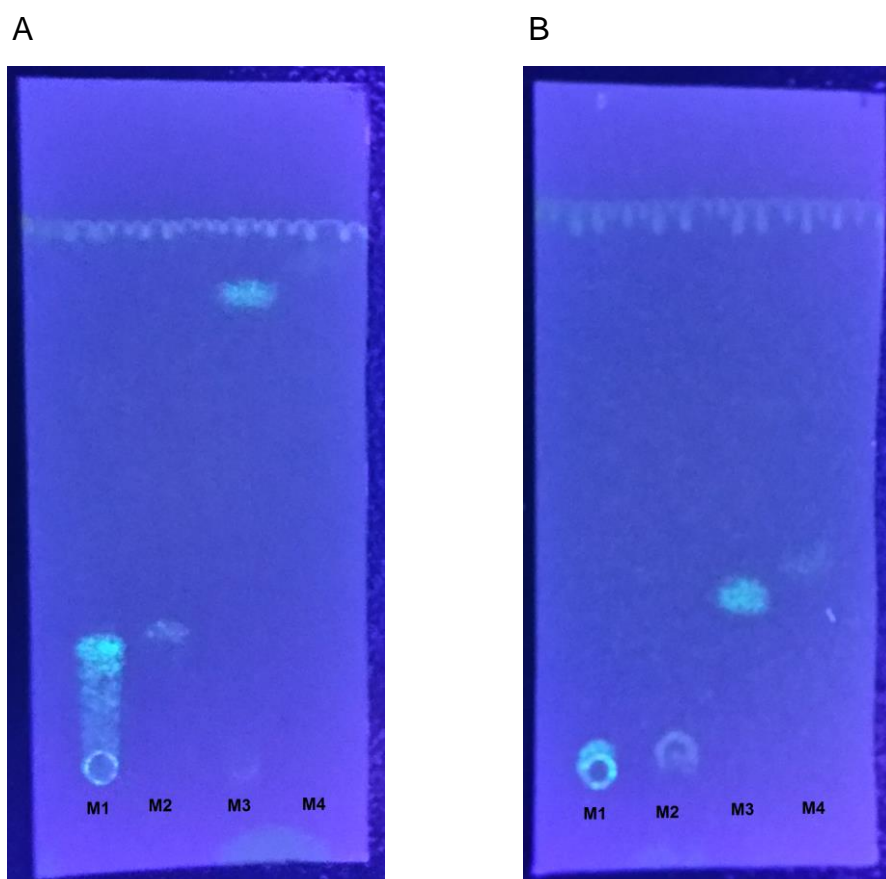


FIGURA 19 – PLACAS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS METABÓLITOS GLUCORINADOS (M1 E M2) E SULFATADOS (M3 E M4) DA CUMARINA ENCONTRADOS EM URINA HUMANA. Dados: fase móvel acetato de etila:metanol:água (10:2:1 v/v/v) (A); fase móvel acetato de etila:metanol:água (20:2:1 v/v/v) (B)

#### 4.4.3 Cromatografia em coluna

Para separação dos metabólitos por cromatografia em coluna de vidro, inicialmente as urinas dos voluntários coletadas entre os tempos de 0 a 8 horas foram liofilizadas, tornando-as compatíveis com a técnica.

A primeira cromatografia foi realizada com a fase móvel composta por acetato de etila:metanol:água (20:2:1 v/v/v) em modo isocrático de eluição. As frações coletadas foram evaporadas até cerca de 2 mL e injetadas no CLUE-EM, a fim de acompanhar quais substâncias estavam presentes em cada uma delas. Os metabólitos sulfatados (M3 e M4) apareceram nas frações 7 a 14, enquanto que os

metabólitos glucorinados estavam presentes nas frações 57 a 70 (M1 e M2). Nas frações 57 a 59 o M2 apresentou pico mais intenso enquanto que nas frações 63-70 o M1 era o pico principal.

Para reduzir o número de frações coletadas, foram realizadas mais duas cromatografias em coluna utilizando fase móvel de maior polaridade e eluída em modo gradiente (da fração 1 a 20 foi utilizada fase móvel composta de acetato de etila:metanol:água 10:2:1 v/v/v e, da fração 20 a 40, acetato de etila:metanol:água 8:4:1 v/v/v). Os metabólitos sulfatados (M3 e M4) eluíram em frações semelhantes às obtidas na primeira coluna. Já os metabólitos glucorinados (M1 e M2) passaram a sair em torno da 25ª fração. Porém, com essa modificação na fase móvel, não foi possível obter frações em que o M2 fosse o pico mais intenso, apenas uma mistura de M1 e M2 em que o M1 sempre era o metabólito majoritário, diferentemente do que foi observado com a primeira coluna.

As frações semelhantes foram misturadas e levadas à secar no concentrador de amostras até que restasse apenas resíduo sólido. O sólido obtido após evaporação dos solventes dos metabólitos glucorinados tinha característica de pó amarelo claro. Já para os sulfatados, foram obtidos cristais esbranquiçados contaminados por um pó marrom. Quando injetada essa mistura no CLUE-EM, foi possível observar a presença de contaminantes. Para tentar deixar a amostra mais pura, os cristais foram lavados com metanol seco, que visivelmente solubilizava o pó marrom, retirando-o da amostra, e deixava os cristais intactos. Depois desse procedimento, foi verificado por CLUE-EM que a intensidade dos contaminantes havia sido consideravelmente reduzida. Dessa forma, foram feitas análises por RMN das frações contendo o M2 mais intenso, obtido apenas na primeira coluna, das frações contendo M1 mais intenso, obtido em todas as colunas, e das frações com mistura das substâncias sulfatadas, também obtidas em todas as colunas.

As amostras não foram totalmente purificadas, ou seja, havia algumas impurezas presentes. Porém, as intensidades dos sinais dos metabólitos, quando injetados no CLUE-EM, apareceram consideravelmente maior do que das impurezas. Desta forma, passou-se ao próximo passo: análise por RMN para elucidação estrutural dos metabólitos.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO METABÓLITO M1

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  do primeiro metabólito glucoronado (M1, Anexo 1) apresentou sinais em  $\delta 5,24$  ppm (*d*,  $J=7,7$  Hz, 1H),  $\delta 6,38$  ppm (*d*,  $J=9,5$  Hz, 1H),  $\delta 7,12-7,14$  ppm (*m*, 2H),  $\delta 7,64$  ppm (*d*,  $J=9,3$  Hz, 1H) e  $\delta 8,00$  ppm (*d*,  $J=9,5$  Hz, 1H).

O sinal a  $\delta 6,38$  (*d*,  $J=9,5$  Hz, 1H) acoplou com o sinal a  $\delta 8,00$  ppm (*d*,  $J=9,5$  Hz, 1H), confirmado pelo mapa de correlação (Anexo 2), o que é característico para os dois hidrogênios do anel lactônico  $\alpha$ - $\beta$  insaturado de cumarinas. O sinal a  $\delta 7,64$  ppm (*d*,  $J=9,3$  Hz, 1H) apresentou  $J$  característico para anel aromático com dois hidrogênios vicinais, porém a percepção do acoplamento *orto* foi dificultada porque o sinal a  $\delta 7,11-14$  ppm (*m*, 2H) apresentou-se como um multipletto com integração para dois hidrogênios. Contudo, o mapa de correlação deixou claro que há relação entre os sinais  $\delta 7,11-14$  ppm (*m*, 2H) e  $\delta 7,64$  ppm (*d*,  $J=9,3$  Hz, 1H), indicando que o anel aromático deve estar substituído em 7, com sistema de hidrogênios *orto* e *para*, o que é característico da substância 7-hidroxicumarina. O sinal a  $\delta 5,24$  ppm (*d*,  $J=7,7$  Hz, 1H) corresponde ao hidrogênio anomérico, condizente com a conjugação ao ácido glicurônico na configuração  $\beta$  (DUUS; GOTFREDSEN; BOCK, 2000; BUBB, 2006).

Estes sinais de RMN  $^1\text{H}$  estão de acordo com os obtidos por Fisher e colaboradores (2001), que isolaram a substância 7-hidroxicumarina glucoronida. A região relativa ao açúcar não foi levada em consideração para a elucidação da estrutura, pois, como a amostra não se encontrava pura, muitos sinais interferentes apareceram nessa região. Porém, a massa exata de 338,0638 Da obtida pelo espectrômetro de massas de alta resolução e o fato de a 7-hidroxicumarina glucoronida ser sabidamente o principal metabólito da cumarina de acordo com a literatura científica indicam fortemente que se trata dessa substância. A sua estrutura está representada na Figura 20.

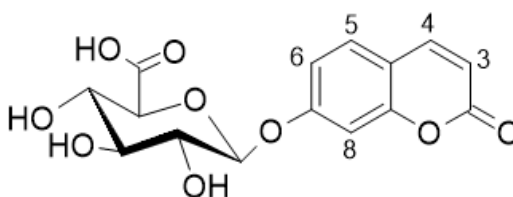


FIGURA 20 – ESTRUTURA DA 7-HIDROXICUMARINA GLUCORONIDA ISOLADA DA URINA DE VOLUNTÁRIOS QUE RECEBERAM 500 MG DE CUMARINA

#### 4.6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO METABÓLITO M2

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  desse metabólito (M2, Anexo 3) identificou a presença de impurezas, mas os sinais a  $\delta 5,25$  ppm (*d*,  $J=7,8$  Hz, 2H),  $\delta 6,50$  ppm (*d*,  $J=9,7$  Hz, 1H),  $\delta 7,15$  ppm (*bd*,  $J=8,32$  Hz, 4H),  $\delta 7,61$  ppm (*t*,  $J=8,43$  Hz, 1H) e  $\delta 8,38$  ppm (*d*,  $J=9,7$  Hz, 1H) puderam ser utilizados para a identificação da substância aqui proposta. Assim como para o M1, a região no espectro contendo os hidrogênios do açúcar não foi utilizada para a elucidação estrutural, pelo fato de estar poluída pelos sinais de outras substâncias. A integração do sinal em  $\delta 7,15$  ppm condizente com quatro hidrogênios está relacionada ao fato de que a amostra se tratava de uma mistura, desta forma o isômero substituído na posição 7 também estava presente, o que causou um acúmulo de sinais nessa região.

Os sinais em  $\delta 6,50$  ppm (*d*,  $J=9,7$  Hz, 1H) e  $\delta 8,38$  ppm (*d*,  $J=9,7$  Hz, 1H) apresentaram  $J$  iguais e foram atribuídos aos dois hidrogênios nas posições 3 e 4, característicos do anel lactônico  $\alpha$ - $\beta$  insaturado de cumarinas. O ligeiro deslocamento em direção à região mais blindada do espectro de RMN  $^1\text{H}$  pode ser devido à presença do oxigênio ligado na posição 5. Os sinais a  $\delta 7,15$  ppm (*bd*,  $J=8,32$  Hz, 4H) indicaram a presença de dois hidrogênios desta substância e dois da impureza. Estes sinais acoplaram com o sinal a  $\delta 7,61$  ppm (*t*,  $J=8,40$  Hz, 1H), indicando um sistema de três hidrogênios vicinais. O fato de os sinais de dois hidrogênios terem aparecido no mesmo local ( $\delta 7,15$  ppm, *bd*) é coerente com a presença de oxigênio na posição 5 (O-glucoronídeo) e 1 (O-éster lactônico da cumarina). A pequena diferença no valor da constante de acoplamento se deveu ao fato de estarem presentes quatro sinais de hidrogênio no mesmo local. O mapa de

correlação confirmou a presença de um sistema com três hidrogênios aromáticos vicinais (Anexo 4).

O hidrogênio anomérico apresentou sinal em  $\delta$ 5,25 ppm (*d*,  $J=7,8$  Hz, 2H), condizente com a conjugação ao ácido glicurônico na configuração  $\beta$  (DUUS; GOTFREDSEN; BOCK, 2000; BUBB, 2006). Houve sinal de dois hidrogênios devido à contaminação pela 7-hidroxicumarina glucoronida, que apresentou um hidrogênio com o mesmo deslocamento químico.

O espectro de massas de alta resolução apresentou a mesma massa do composto discutido anteriormente, 338,0638 Da. Também foi realizado o experimento de HSQC (Anexo 5), cujos resultados se encontram na Tabela 5.

TABELA 5 - DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) E  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 150 MHz VIA HSQC) DO METABÓLITO M2

Posição	$\delta\text{H}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta\text{C}$ (ppm)
anomérico	5,25	7,8	100,0
3	6,50	9,7	114,1
4	8,38	9,7	140,3
5	-	-	-
6	7,15	8,32	114,2
7	7,61	8,40	132,9
8	7,15	8,32	110,6

Em vista destes resultados, sugere-se que o metabólito M2 se trate da 5-hidroxicumarina glucoronida. Não foram encontrados relatos na literatura de essa substância já ter sido isolada e identificada. Porém, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  é congruente com os dados encontrados para a substância 5-hidroxicumarina (SADAVONGVIVA; SUPAVILAI, 1977, PISANI *et al.*, 2010). A estrutura proposta para o metabólito M2 está representada na Figura 21.

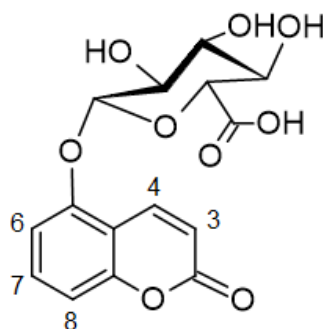


FIGURA 21 – ESTRUTURA DA 5-HIDROXICUMARINA GLUCURONIDA ISOLADA DA URINA DE VOLUNTÁRIOS QUE RECEBERAM 500 MG DE CUMARINA

As estruturas dos metabólitos sulfatados M3 e M4 não puderam ser confirmadas por RMN, pois mesmo com os esforços para tentar isolar, purificar e acumular essas substâncias, a quantidade de amostra não se mostrou suficiente. Entretanto, é de se esperar que as sulfatações ocorram nas mesmas posições das glucoronidações (5 e 7), pois o organismo tende a seguir uma lógica. O metabólito sulfatado na posição 7 já foi relatado na literatura (FORD *et al.*, 2001), assim como o metabólito glucoronado na posição 7. Como a outra glucoronidação foi identificada na posição 5, é esperado que a outra sulfatação também ocorra na posição 5.

#### 4.7 PRODUTOS DE EXCREÇÃO E SEQUÊNCIAS DE METABOLIZAÇÃO DA CUMARINA EM HUMANOS

A partir dos resultados obtidos com o presente trabalho, propomos as estruturas de alguns dos metabólitos da cumarina levando em conta os principais mecanismos de detoxificação encontrados (hidroxilação, glucoronidação e sulfatação). Também sugerimos em qual sequência as metabolizações possivelmente ocorrem no organismo humano (Figura 22). Além das substâncias representadas na figura a seguir, pudemos evidenciar a presença de outros metabólitos excretados, porém, como são minoritários e não foram alvo de isolamento no presente no trabalho, o local exato da biotransformação não foi confirmado.

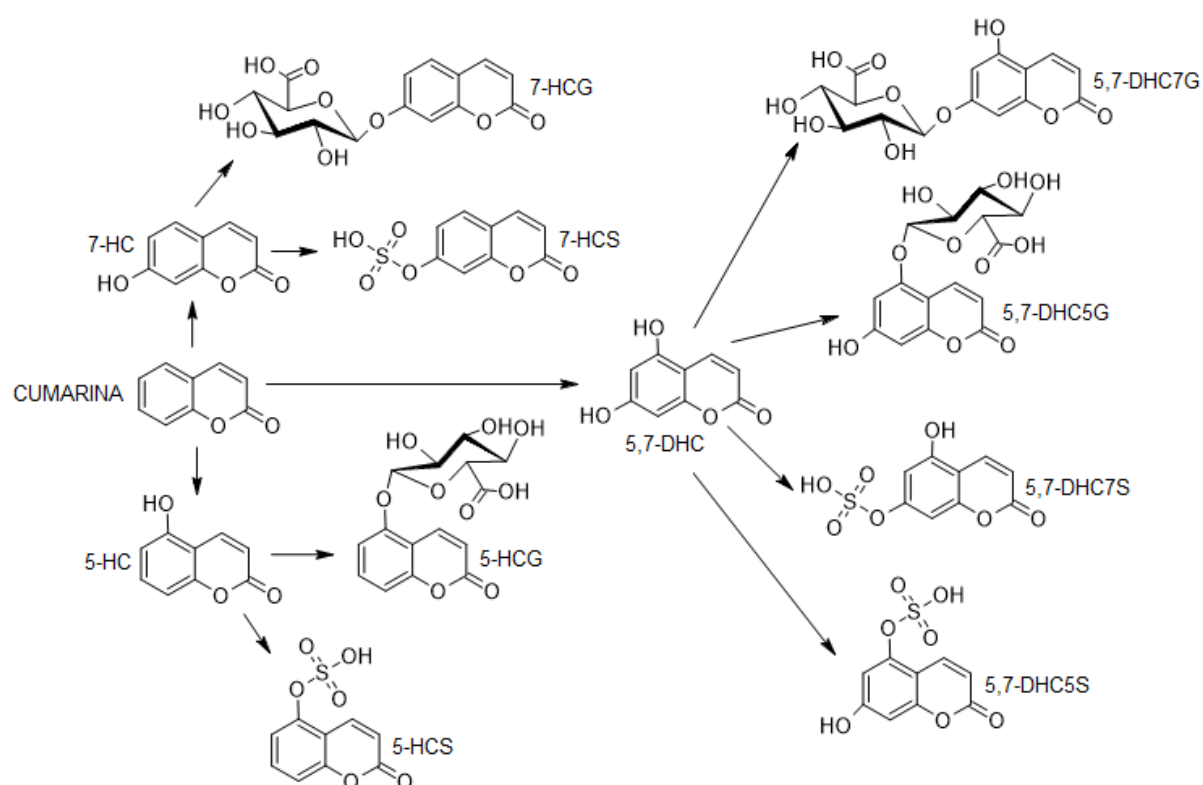


FIGURA 22 – ESQUEMA PROPONDO SEQUÊNCIAS DE METABOLIZAÇÃO DA CUMARINA EM HUMANOS A PARTIR DAS HIDROXILAÇÕES NAS POSIÇÕES 5 E 7.

Dados: 7-hidroxycumarina (7-HC); 7-hidroxycumarina glucoronida (7-HCG); 7-hidroxycumarina sulfatada (7-HCS); 5-hidroxycumarina (5-HC); 5-hidroxycumarina glucoronida (5-HCG); 5-hidroxycumarina sulfatada (5-HCS); 5,7-di-hidroxycumarina (5,7-DHC); 5,7-di-hidroxycumarina-(7)-glucoronida (5,7-DHC7G); 5,7-di-hidroxycumarina-(5)-glucoronida (5,7-DHC5G); 5,7-di-hidroxycumarina-(7)-sulfatada (5,7-DHC7S); 5,7-di-hidroxycumarina-(5)-sulfatada (5,7-DHC5S)

## 5 CONCLUSÃO

Com o presente estudo, foi possível constatar que no metabolismo humano existe uma segunda rota de hidroxilação da cumarina além da via da 7-hidroxilação, até então a única descrita na literatura. Apesar de não terem sido realizados ensaios quantitativos, foi possível observar que esta é uma importante rota de excreção da cumarina, pois os picos relativos aos isômeros glucorinados e sulfatados M1, M2, M3 e M4 puderam ser claramente observados no cromatograma total da urina dos voluntários que receberam 500 mg cumarina.

Dos 12 metabólitos encontrados, apenas quatro já haviam sido descritos na literatura como produtos de excreção da cumarina em urina humana (7-hidroxicumarina, 7-hidroxicumarina glucoronida, 7-hidroxicumarina sulfatada e ácido o-hidroxifenilacético), demonstrando que, apesar de a cumarina ser uma substância simples e que já foi tema de diversos estudos, as informações sobre seu metabolismo estavam incompletas. Isso mostra que é de suma importância a realização constante de novos estudos sobre metabolização por técnicas mais modernas, não só de substâncias naturais como a cumarina, mas de todas as substâncias a que estamos expostos, incluindo medicamentos e produtos cosméticos, que já não são mais estudados com esse foco.

O uso do *software* MetaboLynx foi essencial para a identificação dos metabólitos. Sem o seu auxílio, o processo de identificação teria sido laborioso e demorado, e alguns metabólitos pouco intensos poderiam ter sido negligenciados. Porém, é importante ressaltar que o *software* deve ser usado com precaução, para evitar o relato de resultados falso-positivos como metabólitos. O *software* funciona como um grande aliado do pesquisador, mas é necessário que este tenha conhecimentos sobre cromatografia, espectrometria de massas e biotransformações para não cometer enganos.

Com o uso da cromatografia de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução juntamente com o *software* MetaboLynx foi possível criar um método rápido e fácil para identificar com exatidão quais as biotransformações foram sofridas pela cumarina. Porém, não foi possível afirmar em quais posições da molécula as biotransformações ocorreram. Para isso, recorreremos a técnicas



alternativas para isolamento e purificação dos metabólitos e posterior elucidação estrutural por ressonância magnética nuclear. Foi possível confirmar a estrutura de duas substâncias por RMN: 7-hidroxycumarina glucoronida e 5-hidroxycumarina glucoronida. Esse último resultado é de extrema importância, pois sugere que a segunda rota de hidroxilação observada *in vivo* ocorra na posição 5 da cumarina. A elucidação estrutural dos outros metabólitos e a identificação das enzimas envolvidas no processo ainda são necessárias para se estabelecer todas as rotas de metabolização da cumarina em humanos. Estudos sobre os efeitos benéficos e toxicológicos dos metabólitos encontrados também devem ser realizados.

## REFERÊNCIAS

- Abraham, K.; Pfister, M.; Wohrlin, F.; Lampen, A. Relative bioavailability of coumarin from cinnamon and cinnamon-containing foods compared to isolated coumarin: a four-way crossover study in human volunteers. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 4, p.644-653, 2011.
- Bighetti, A. E.; Antonio, M. A.; Kohn, L. K.; Rehder, V. L.; Foglio, M. A.; Possenti, A.; Vilela, L.; Carvalho, J. E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1, p. 72-77, 2005.
- Bogan, D. P.; Deasy, B. O'Kennedy, R., Smyth, M. R., Fuhr, U. Determination of free and total 7-hydroxycoumarin in urine and serum by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 663, p. 371-378, 1995.
- Bogan, D. P.; Thornes, R.D.; Tegtmeier, M.; Schafer, E. A.; O'Kennedy, R. Direct Determination of 7-hydroxycoumarin and 7-hydroxycoumarin-glucuronide in urine by using capillary electrophoresis. **The Analyst**, v. 121, p. 243-247, 1996.
- Booth, A. N.; Masri, M. S.; Robbins, D. J.; Jones, E. F. T.; Deeds, F. Urinary metabolites of coumarin and o-coumaric acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 4, p.946-948, 1959.
- Bubb, W. A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: characterizing the structural complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 19, p. 1-19, 2003.
- Born, S. L.; Rodriguez, P. E.; Eddy, C. L.; Lehman- McKeeman, L. D. Synthesis and reactivity of coumarin 3,4-epoxide. **Drug Metabolism and Disposition**. v. 25, p. 1318-1323, 1997.
- Born, S. L.; Hu, J. K.; Lehman- McKeeman, L. D. o-hydroxyphenylacetaldehyde is a hepatotoxic metabolite of coumarin. **Drug Metabolism and Disposition**. v. 28, n. 2, p. 218-223, 1999.
- Brasil. ANVISA. Instrução normativa n. 5 de 11 de dezembro de 2008 - Determina a lista de registro simplificado de fitoterápicos no Brasil - Revoga o disposto da Resolução RE n. 89 de 16 de março de 2004. Diário Oficial da União. Brasília - DF, 2008.
- Casley-Smith J. R.; Casley-Smith J. R. Frequency of coumarin hepatotoxicity. **Medical Journal of Australia**, v. 162, n. 7, p. 391, 1995.
- Cholerton, S; Idle, M. E.; Vas, A. Comparison of a novel thin-layer chromatographic-fluorescence detection method with a spectrofluorometric method for the determination of 7-hydroxycoumarin in human urine. **Journal of Chromatography**, n. 575, p.325-330, 1992.

Cohen, A. J. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 17, p.277-289, 1979.

Cox D.; O'Kennedy R.; Thornes R. D. The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2-benzopyrone). **Human and Experimental Toxicology**, v. 8, n. 6, p. 501-506, 1989.

Dass, C. **Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

Dempsey, E.; O'Sullivan, C; Smyth, M; Egan, D.; O'Kennedy, R.; Wang, J. Differential pulse voltammetric determination of 7-hydroxycoumarin in human urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 11, n. 6, p. 443-446, 1993.

den Besten, C.; Körösi, S. A.; Beamand, J. A.; Walters, D. G; Lake B. G. Studies on the mechanism of coumarin-induced toxicity in rat hepatocytes. **Toxicology in vitro**, v. 4, p. 518-521, 1990.

Duus, J. O.; Gotfredsen, C. H.; Bock, K. Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern Methods and Limitations. **Chemical Reviews**, v. 100, p. 4589-4614, 2000.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the European Commission on Coumarin in flavourings and other food ingredients with flavouring properties. **The EFSA Journal**, v. 793, p. 1-15, 2008.

Egan, D. A.; O'Kennedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., Thornes, R. D. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin-related compounds. **Drug Metabolism Reviews**, v. 22, n. 5, p. 503-509, 1990.

Egan, D. A.; O'Kennedy, R. Rapid and sensitive determination of coumarin and 7-hydroxycoumarin and its glucuronide conjugate in urine and plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 582, n. 1-2, p. 137-143, 1992.

Egan, D. A.; O'Kennedy, R. Spectrofluorimetric method for the quantification of 7-hydroxycoumarin in urine and plasma using both extracted and unextracted samples. **The Analyst**, v. 118, n. 2, p. 201-203, 1993.

Eisenreich, W.; Bacher, A. Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2799-2815, 2007.

Felter, S. P.; Vassallo, J. D.; Carlton, B. D., Daston, G. P. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44. p.462-475, 2006.

Fentem, J.H.; Fry, J.R.; Whiting, D.A. *o*-hydroxyphenylacetaldehyde: a major novel metabolite of coumarin formed by rat, gerbil and human liver microsomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 179, p. 197–203, 1991.

Fentem, J. H.; Hammond, A. H.; Garle, M. J.; Fry, J. R. Toxicity of coumarin and various methyl derivatives in cultures of rat hepatocytes and V79 cells. **Toxicology in vitro**. v. 6, p. 21-25, 1992.

Fentem, J. H.; Fry, J. R. Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 104C, p. 1-8, 1993.

Fernandez-Salguero, P.; Hoffman, S. M. G.; Cholerton, S.; Mohrenweiser, H.; Raunio, H.; Rautio, A.; Huang, J.-D.; Evans, W. E.; Idle, J. R.; Gonzalez, F. J. A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles. **American Journal of Human Genetics**. v. 57, p. 651-660, 1995.

Feron, V.J. ; Til, H. P.; De Vrijer, F.; Woutersen, R.A.; Cassee, F.R.; Van Bladder, P.J. Aldehydes: Occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. **Mutation Research**, v. 259, p. 363–385, 1991.

Feuer, G. The metabolism and biological actions of coumarins. In: ELLIS, G.P.; WEST, G.B. **Progress in Medicinal Chemistry**. Amsterdã: North-Holland Publishing Company, 1974. v. 10, p. 85-158.

Fisher, M. B.; Jackson, D.; Kaerner, A.; Wrighton, S. A.; Borel, A. G. Characterization by liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry of two coupled oxidative-conjugative metabolic pathways for 7-ethoxycoumarin in human liver microsomes treated with alamethicin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, p. 270-275.

Ford, R. A.; Hawkins, D. R.; Mayo, B. C.; Api, A. M. The *in vivo* dermal absorption and metabolism of [4-<sup>14</sup>C] coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39. p.153-162, 2001.

Gasparetto, J. C.; Pontarolo, R.; De Francisco, T. M. G.; Campos, F. R. *Mikania glomerata* and *M. laevigata*: Clinical and Toxicological Advances. In: WILLIAM ACREE. **Toxicity and Drug Testing**. Rijeka: Intech, 2012. p. 297-320.

Gasparetto, J. C. **Avaliação da biodisponibilidade dos principais metabólitos secundários do guaco a partir da forma farmacêutica xarope**. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

Brunton, L. L.; Chabner, B. A.; Knollmann, B. C. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. China: McGraw-Hill Education, 2011. cap 2.

Hadidi, H.; Zahlsen, K.; Idle, J. R.; Cholerton, S. A single amino acid substitution (leu160his) in cytochrome p450 cyp2a6 causes switching from 7-hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 903-907, 1997.

Human Metabolome Database (HMDB). HMDB02641. Disponível em: <http://www.hmdb.ca/metabolites/hmdb02641>. Acesso em: 08/08/2014.

Huwer, T.; Altmann, H-J.; Grunow, W.; Lehnardt, S.; Przybylski, M.; Eisenbrand, G. Coumarin mercapturic acid isolated from rat urine indicates metabolic formation of coumarin 3,4-epoxide. **Chemical Research in Toxicology**, v. 4, n. 5, p. 586-590, 1991.

Iscan, M.; Rostami, H.; Guray, T.; Iscan, M.; Pelkonen, O.; Rautio, A. Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in a Turkish population. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, n. 4, p.315-318, 1994.

Kaighen, M.; Willians, R. T. The metabolism of [3-<sup>14</sup>C] coumarin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 3, n.1, p. 25-43, 1961.

Lacy, A.; O'Kennedy, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 30, p. 3797-3811, 2004.

Lake B. G. Investigations into the mechanism of coumarin-induced hepatotoxicity in the rat. **Archives of Toxicology**, Supl. 7, p. 16-29, 1984.

Lake, B.G.; Gray, T. J. B.; Evans, J. G.; Lewis, D. F. V.; Beamand, J. A.; Hue, K. L. Studies on the mechanism of coumarin-induced toxicity in rat hepatocytes: comparison with dihydrocoumarin and other coumarin metabolites. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 97, p. 311-323, 1989.

Lake, B.G.; Evans, J. G.; Lewis, D. F. V.; Price, R.J. Studies on the acute effects of coumarin and some coumarin derivatives in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 357-363, 1994a.

Lake, B.G.; Evans, J. G.; Lewis, D. F. V.; Price, R.J. Comparison of the hepatic effects of coumarin, 3,4-dimethylcoumarin, dihydrocoumarin and 6-methylcoumarin in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 8, p. 743-751, 1994b.

Lake, B. G. Coumarin metabolism, toxicity, and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 423-453, 1999.

Liang, Y.; Wang, G.; Xie, L.; Sheng, L. Recent Development in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Emerging Technologies for Metabolite Identification. **Current Drug Metabolism**, v. 12., p. 329-344, 2011.

Ma, S.; Chowdhury, S. K. Analytical Strategies for Assessment of Human Metabolites in Preclinical Safety Testing. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 5028-36, 2011.

Maggio, R. M.; Calvo, N. L.; Vignaduzzo, S. E.; Kaufman, T. S. Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p.102-122, 2014.

Maldaner, L.; Jardim, I. C. F. S. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

Marshall, M.E.; Mohler, J. L.; Edmonds K.; Williams B.; Butler K.; Ryles M.; Weiss L.; Urban D.; Bueschen A.; Markiewicz M; Cloud G. An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, n. 1, p. S39-S42, 1994.

Meineke, I.; Desel, H.; Kahl, R.; Kahl, G. F.; Gundert-Remy, U. Determination of 2-hydroxyphenylacetic acid (2HPAA) in urine after oral and parenteral administration of coumarin by gas-liquid chromatography with flame-ionization detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n. 3, p.487-492, 1998.

Moran, E; O'Kennedy, R.; Thornes, R.D. Analysis of coumarin and its urinary metabolites by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 24, n. 416, p. 165-169, 1987.

Myers, R. B.; Parker, M.; Grizzle, W. E. The effects of coumarin and suramin on the growth of malignant renal and prostatic cell lines. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, p. S11-3,1994.

Nováková, L.; Solichová, D.; Solich, P. Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 16, p. 2433-2443, 2006.

Nutrition and Food Research Institute (TNO). **Volatile Compounds in Food, Qualitative and Quantitative Data**. 7 ed. Holanda: TNO, 1996.

Opdyke, D. L. J. Monographs on fragrance raw materials: coumarin. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 12, n. 3, p. 385-405, 1974.

Pisani, L.; Catto, M.; Giangreco, I.; Leonetti, F.; Nicolotti, O.; Stefanachi, A.; Cellamare, S.; Carotti, A. Design, synthesis, and biological evaluation of coumarin derivatives tethered to an edrophonium-like fragment as highly potent and selective dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. **ChemMedChem**, v. 5, p. 1616-1630, 2010.

PubChem. Compound summary (CID 323). Disponível em <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=323#x27>. Acesso em 01/07/2013.

Rautio, A.; Kraul, H.; Salmela, E.; Pelkonen, O. Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteers. **Pharmacogenetics**, v. 2, n. 5, p.227-233, 1992.

Ritschel, W. A.; Brady, M. E.; Tan, H. S. I.; Hoffman, K. A.; Yiu, I. M.; Grummich, K. W. Pharmacokinetics of coumarin and its 7-hydroxy-metabolites upon intravenous and peroral administration of coumarin in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 12, n. 6, p. 457-461, 1977.

Ritschel, W. A.; Brady, M. E.; Tan, H. S. First-pass effect of coumarin in man. **International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy**, v. 17, n. 3, p.99-103, 1979.

Ritschel, W. A.; Hoffman, K. A. Pilot study on bioavailability of coumarin and 7-hydroxycoumarin upon peroral administration of coumarin in a sustained-release dosage form. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 7, p. 294-300, 1981.

Runkel, M.; Tegtmeier, M.; Legrum, W. Metabolic and analytical interactions of grapefruit juice and 1,2-benzopyrone (coumarin) in man. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 50, n. 3, p. 225-230, 1996.

Sadavongvidad, C.; Supavilai, P. Three monohydroxycoumarins from *Alyxia lucida*. **Phytochemistry**, v. 16, p.1451, 1977.

Shargel, L.; Wu-Pong, S.; Yu, A. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. Estados Unidos da América: McGraw-Hill Education, 2012. cap 11.

Shilling, W. H.; Crampton, R. F.; Longland, R. C. Metabolism of Coumarin in Man. **Nature**, v. 221, n. 5181, p.664-665, 1969.

Soine, T.O. Naturally occurring coumarins and re-lated physiological activities. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 3, p. 231-264, 1964.

Tan, H.S.; Ritschel, W. A.; Sanders, P. R. Determination of coumarin and umbelliferone mixtures in whole blood by spectrophotofluorometry. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 1, p.30-33, 1976.

Tolonen, A.; Turpeinen, M.; Pelkonen, O. Liquid chromatography–mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening. **Drug Discovery Today**. v. 14, n. 3/4, p. 120-133, 2009.

Thornes, R. D.; Daly, L.; Lynch, G.; Breslin, B.; Browne, H.; Browne, H. Y.; Corrigan, T.; Daly, P.; Edwards, G.; Gaffney, E. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, p. S-32-4, 1994.

van Sumere C. F.; Teuchy H. The metabolismo of [2-<sup>14</sup>C]coumarin and [2-<sup>14</sup>C]-7-hydroxycoumarin in the rat. **Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie**, v. 79, n. 4, p. 665-679, 1971.

Wagner, H.; Bladt. S. **Plant drug analysis**. 2.ed. New York: Springer Verlag, 1996.

Wang, L.; Lien, C. Determination of urinary metabolites of coumarin in human urine by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 19 p. 3077-3088, 2004.

Wang, L.; Jiang, S. Simultaneous determination of urinary metabolites of methoxypsoralens in human and *Umbelliferae* medicines by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 44, p. 473-478, 2006.

Williams R. T.; Millburn P.; Smith R. L. The influence of enterohepatic circulation on toxicity of drugs. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 123, p. 110-124, 1965.

Xie, C.; Chen, X.; Zhong, D. High-Resolution Mass Spectrometry: An Ideal Analytical Tool for Drug Metabolism Studies. 2013. Disponível em: <http://www.chromatographyonline.com/high-resolution-mass-spectrometry-ideal-analytical-tool-drug-metabolism-studies>. Acesso em: 03/2014.

Yamano, S.; Tatsuno, J.; Gonzalez, F. J. The CYP2A3 gene product catalyses coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. **Biochemistry**. v. 29, p. 1322-1329, 1990.

Zhu, M.; Zhang, H.; Humphreys, W. G. Drug Metabolite Profiling and Identification by High-resolution Mass Spectrometry. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 286, n. 29, p. 25419-25, 2011.

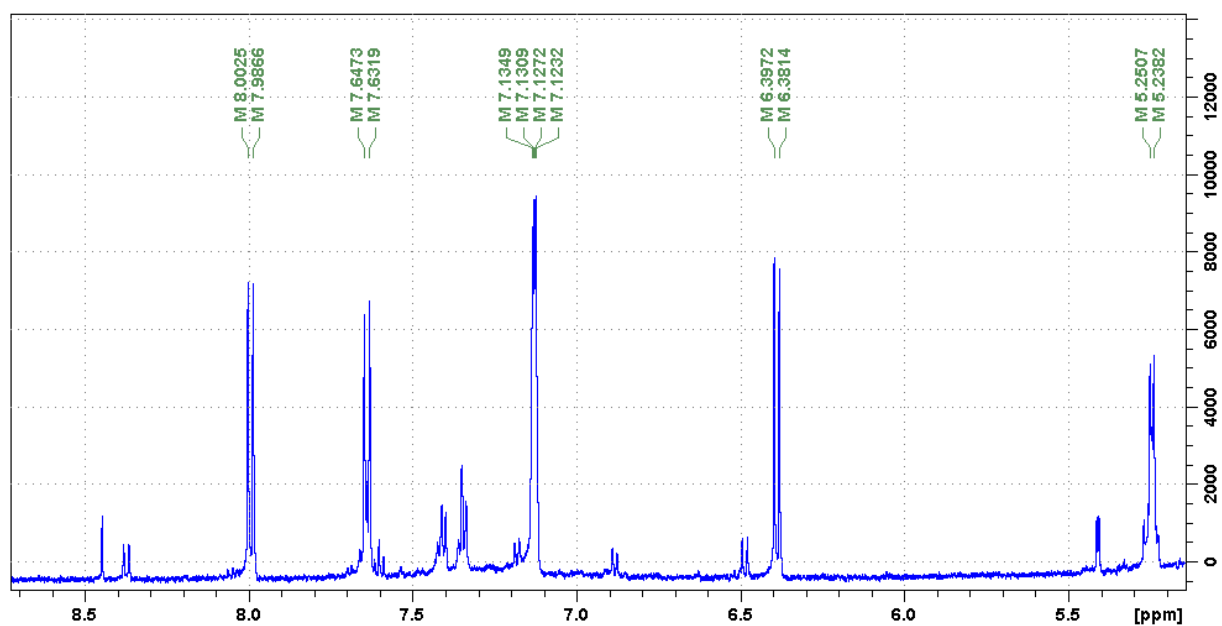


## ANEXOS

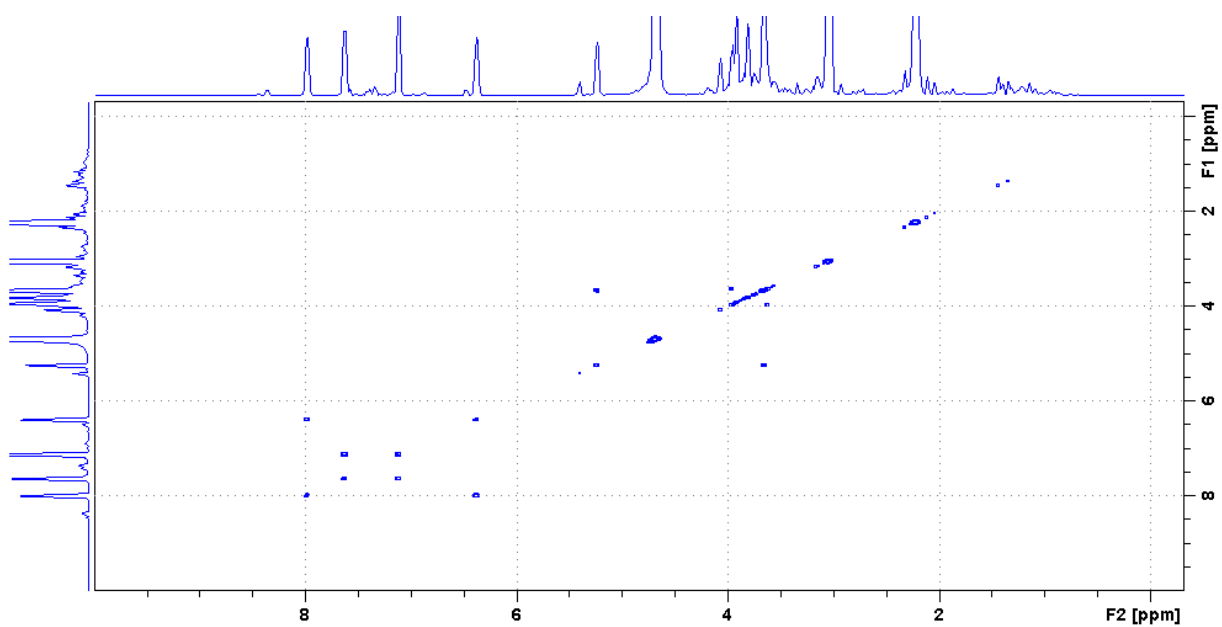
**LISTA DE ANEXOS**

ANEXO 1 –	ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) DA PORÇÃO CUMARÍNICA DO METABÓLITO 1.....	80
ANEXO 2 –	ESPECTRO DE COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) DO METABÓLITO 1.....	80
ANEXO 3 –	ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) DA PORÇÃO CUMARÍNICA DO METABÓLITO 2.....	81
ANEXO 4 –	ESPECTRO DE COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) DO METABÓLITO 2.....	81
ANEXO 5 –	ESPECTRO DE HSQC ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) DO METABÓLITO 2.....	82

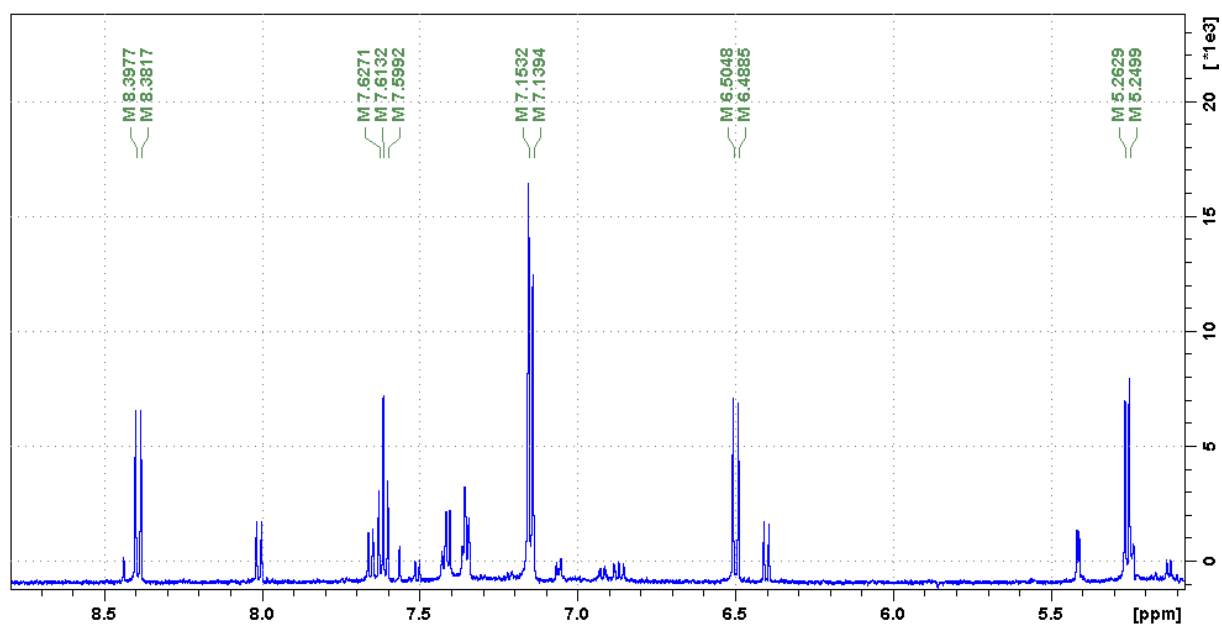
ANEXO 1 – ESPECTRO DERMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) DA PORÇÃO CUMARÍNICA DO METABÓLITO 1



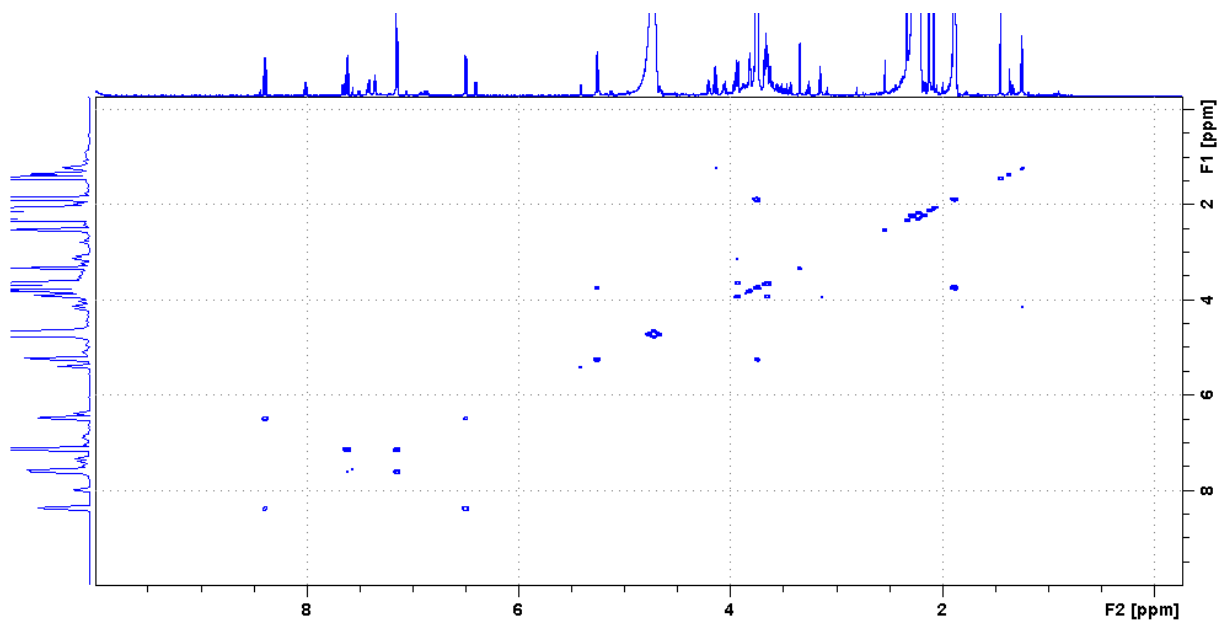
ANEXO 2 – ESPECTRO DE COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) DO METABÓLITO 1



ANEXO 3 – ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) DA PORÇÃO CUMARÍNICA DO METABÓLITO 2



ANEXO 4 – ESPECTRO DE COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ , 600 MHz) DO METABÓLITO 2



ANEXO 5 – ESPECTRO DE HSQC ( $D_2O$ , 600 MHz) DO METABÓLITO 2